

*Masteroppgave i Legemiddelanalyse
for graden Master i Farmasi*

Kan LC-MS brukes i diagnose av narkolepsi?

*Evaluering av ulike prøveopparbeidelsesmetoder av biomarkøren
hypokretin-1 i biologiske matrikser*

Jon Blankenberg Rusten



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høst 2011

Kan LC-MS brukes i diagnose av narkolepsi?

Evaluering av ulike prøveopparbeidelsesmetoder av biomarkøren hypokretin-1 i biologiske matrikser

Jon Blankenberg Rusten

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden februar 2009 til november 2011.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Forord

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine veiledere Léon Reubsæet og Trine Grønhaug Halvorsen for hjelp og støtte under arbeidet med masteroppgaven. Dere har alltid vært tilgjengelige for spørsmål og vært gode samtalepartnere underveis i prosjektet

Takk går også til Klinisk kjemisk avdeling ved Oslo Universitetssykehus Ullevål for hjelp med peptider og antistoffer.

Til sist må jeg også takke alle ved avdelingen for legemiddelanalyse, både ansatte og masterstudenter, for hyggelig samvær og godt miljø.

Blindern, november 2011

Jon Blankenberg Rusten

Innholdsfortegnelse

1. SAMMENDRAG.....	7
2. FORKORTELSER	8
3. INNLEDNING	10
3.1 BAKGRUNN	10
3.2 HENSIKT	11
4. TEORI.....	12
4.1 HYPOKRETIN	12
4.1.1 Struktur.....	14
4.2 CEREBROSPINALVÆSKE	15
4.3 PRØVEOPPARBEIDELSE	16
4.3.1 Tryptisk klipp	16
4.3.2 Proteinfelling	17
4.3.3 Ultrafiltrering	17
4.3.4 Elektromembranekstraksjon (EME).....	18
4.3.5 SPE.....	19
4.3.6 Immunoaffinitet.....	21
4.4 ANALYSE MED LC-MS	22
4.4.1 HPLC	22
4.4.2 MS.....	23
5. MATERIALER OG METODER	26
5.1 PEPTIDER, KJEMIKALIER OG UTSTYR	26
5.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE	28

5.2.1	<i>Hypokretinløsninger</i>	28
5.2.2	<i>Surrogatmatriks</i>	29
5.2.3	<i>Løsninger til tryptisk klipp</i>	29
5.2.4	<i>Løsninger til ultrafiltrering</i>	30
5.2.5	<i>Løsninger til SPE</i>	30
5.2.6	<i>Løsninger til immunoaffinitet</i>	31
5.2.7	<i>Løsninger til LC-MS</i>	33
5.2.8	<i>Utstyr til SPE</i>	34
5.3	METODER TIL PRØVEOPPARBEIDELSE	34
5.3.1	<i>Proteinfelling</i>	34
5.3.2	<i>Ultrafiltrering</i>	35
5.3.3	<i>Elektromembranekstraksjon (EME)</i>	35
5.3.4	<i>Tryptisk klipp med SPE</i>	36
5.3.5	<i>Immunoaffinitet med SPE</i>	36
5.3.6	<i>SPE</i>	38
5.4	METODER FOR LC-MS	39
5.4.1	<i>Oppsett av apparatur</i>	39
5.4.2	<i>HPLC</i>	39
5.4.3	<i>MS</i>	40
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	43
6.1	METODE FOR ANALYSE AV HYPOKRETIN-1	43
6.2	INITIELLE EKSPERIMENTER	43
6.2.1	<i>Hypokretin-1 i vann</i>	43

INNHALDSFORTEGNELSE

6.2.2	<i>Tryptisk klipp av hypokretin-1</i>	44
6.2.3	<i>Stabilitet av hypokretin-1 i vann</i>	48
6.3	PRØVEOPPARBEIDELSE	52
6.3.1	<i>Proteinfelling</i>	52
6.3.2	<i>Ultrafiltrering</i>	56
6.3.3	<i>Elektromembranekstraksjon</i>	57
6.3.4	<i>Proteinfelling-SPE</i>	59
6.3.5	<i>SPE.....</i>	61
6.4	SAMMENLIGNING AV METODER	63
6.5	OPTIMALISERING AV SPE-METODE.....	67
6.5.1	<i>Valg av vaskeløsning.....</i>	67
6.5.2	<i>Valg av elueringsløsning og sorbent</i>	67
6.6	FORSØK MED IMMUNOAFFINITET	70
6.7	VIDERE ARBEID	74
7.	KONKLUSJON	76
	KILDELISTE	77

1. Sammendrag

Det ble utviklet en LC-MS-metode for biomarkøren hypokretin-1 for narkolepsi. Man ønsket å detektere lave konsentrasjoner av peptidet i cerebrospinalvæske (< 110 pg/mL). Metoden ble utviklet ved hjelp av standarder i vandige løsninger. For å kunne bestemme hypokretin-1 i humane prøver ble det jobbet med følgende utfordringer: variasjon i analysedata og valg av prøveopparbeidelsen.

Variasjon i analysedata grunnet adsorpsjon til glassvialer og/eller varierende løslighet av hypokretin-1 i ulike løsemidler ble undersøkt. Polypropylenvialer og 25 % ACN i 20 mM maursyre viste seg til å være mest egnet.

Det ble totalt forsøkt seks prøveopparbeidelsesmetoder for hypokretin-1 løst i en surrogatmatriks: Proteinfelling, ultrafiltrering, elektromembranekstraksjon, immunoaffinitet, proteinfelling-SPE og SPE. Analysedataene ble bedømt etter følgende kriterier: utbytte, relativt standardavvik, kromatogrammer, kvantifiseringsgrense og metodens kompleksitet. Ut fra denne evalueringen ble det bestemt at kun SPE-metoden ble videre optimalisert.

2. Forkortelser

A	Alanin
ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
C	Cystein
CSF	Cerebrospinalvæske
D	Asparaginsyre
Da	Dalton, enhet for molekylvekt
DMP	Dimethyl pimelimidate dihydrochloride
DTT	Dithiotreitol
E	Glutamat
ESI	Elektrosprayionisering
F	Fenylalanin
FA	Formic acid, metansyre, maursyre
G	Glycin
g	Gram, enhet for vekt
H	Histidin
HCOOH	Maursyre, formic acid
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Isoleucin
IAA	Iodoacetic acid
LC	Liquid Chromatography = væskekromatografi
K	Lysin
kDa	Kilodalton, enhet for molekylvekt
L	Leucin
M	Metionin, aminosyre
M	Molar, mol/liter
mM	Millimolar, 1×10^{-3} mol/liter
MeOH	Metanol

Mi	Monoisotop
min	Minutter
missed cleavages	Resultat av ufullstendig proteolyse
mol	Enhet for stoffmengde
MS	Mass Spectrometry = massespektrometri
m/z	Masse-ladnings-forhold
N	Asparagin
ng	nanogram
NH ₄ OH	Ammoniumhydroksid
P	Prolin
pg	Pikogram
PP-SPE	Protein Percipitation = Proteinfelling (og fast-faseekstraksjon)
Q	Glutamin
R	Arginin
RIA	Radioimmunoassay
Rpm	Revolutions/rounds per minute
S	Serin
S/N	Signal-to-noise ratio, signal-til-støyforhold
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Fast-faseekstraksjon (Solid Phase Extraction)
RSD	Relativt standardavvik
SQ	Singelkvadrupol
T	Treonin
t_R	Retensjonstid
TFA	Trifluoroacetic acid, trifluoroeddiksyre
Torr	Enhet for trykk
V	Valin
v/v	Volumprosent
W	Tryptofan

3. Innledning

3.1 Bakgrunn

Narkolepsi er en kronisk nevrologisk tilstand som rammer 0,02 – 0,05 % av befolkningen [1]. Tilstanden karakteriseres søvnanfall og hypersomnia. Anfallene kan komme plutselig og er ukontrollerbare. Lengden på søvnanfallene kan variere, men varer sjelden lengre enn noen få minutter. Klassisk narkolepsi er ofte forbundet med katapleksi. Kataplektiske anfall kjennetegnes av kortvarig tap av muskelkontroll. Søvnparalyse, hypnagoge hallusinasjoner og automatismer er symptomer som også assosieres med narkolepsi [2].

Man kjenner ennå ikke årsaken til narkolepsi. Det er funnet en kobling mellom narkolepsi og Human Leucocyte Antigen (HLA)-DQB1*06022. Det viser seg at 95 % av narkoleptiske pasienter med katapleksi har dette antigenet [3]. Da 25 % av den europeiske befolkningen har HLA-DQB1*06022, må man utføre komplementære tester. Multiple Sleep Latency Test og SOREM (sleep-onset REM) er begge diagnostiske verktøy i tillegg til HLA-typing. De siste årene har man også sett at hypokretin kan spille en rolle for diagnostisering av narkolepsi.

Allerede i 2000 fant Nishino en sterk sammenheng mellom lave hypokretin-1-nivåer og narkolepsi hos mennesker [4]. Året etter ble studien utvidet og det ble tatt prøver av 38 narkoleptiske pasienter med katapleksi. Av disse hadde 32 pasienter hypokretin-1-nivåer lavere enn 100 pg/mL [3]. Nishinos resultater er senere bekreftet i flere og større studier [2, 5, 6]. Den nyere tids funn har gjort at lave hypokretin-1-nivåer (< 110 pg/mL) i CSF er blitt et kriterium for diagnose av narkolepsi jfr. International Classification of Sleep Disorders [7].

Økt fokus på hypokretin-1 i patologien til narkolepsi har også skapt et behov for gode analysemetoder for peptidet. Siden knapt målbare konsentrasjoner av hypokretin-1 kjennetegner narkolepsi med katapleksi, er det flere utfordringer forbundet med utvikling av en robust analysemetode. Hittil er radioimmunoassay (RIA) den foretrukne metoden. Metoden gir høy grad av sensitivitet og kan bestemme konsentrasjoner på lavt pg/mL-nivå [2]. Selv om metoden har høy sensitivitet kan den ha noe dårligere spesifisitet sammenlignet med for eksempel massespektrometri. Den er dessuten kostbar og tidkrevende. LC-MS er foreløpig ikke brukt i analyse av hypokretin-1. En robust LC-MS-metode for hypokretin-1 som detekterer peptidet i lave konsentrasjoner hadde vært nyttig i diagnostisk øyemed. Det er en enkel og rask metode som er svært spesifikk overfor analytten. Analysetiden er dessuten forholdsvis kort.

3.2 Hensikt

Hovedmålet med oppgaven var å utvikle en metode ved bruk av LC-MS for å identifisere og kvantifisere lave konsentrasjoner av hypokretin-1 i biologiske matrikser. Dette innebærer konsentrasjoner lavere enn 110 pg/mL.

For å oppnå dette ble følgende delmål satt opp:

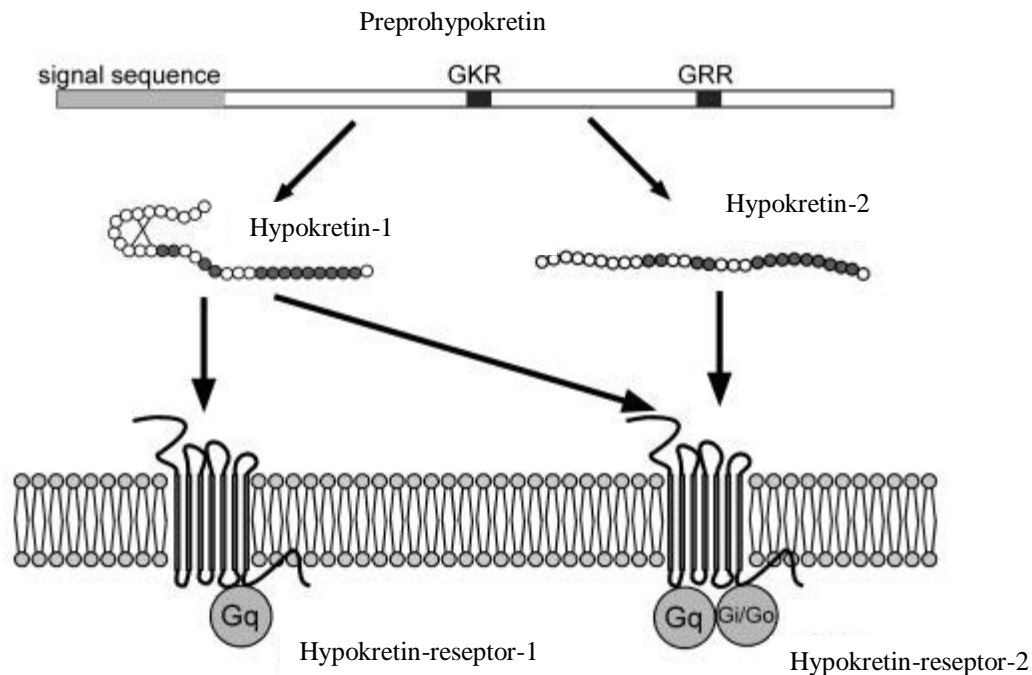
- Detektere hypokretin-1 med LC-MS.
- Utføre tryptisk klipp av hypokretin-1 for å identifisere eventuelle signaturpeptider som kan brukes som biomarkør.
- Utvikle en LC-MS SIM-metode for hypokretin-1.
- Detektere hypokretin-1 i biologisk matriks. Først i en surrogatmatriks av fortynnet serum, deretter i cerebrospinalvæske.
- Utprøving av relevante opprensingsmetoder for hypokretin-1 i biologisk matriks for å sikre så godt utbytte som mulig og oppkonsentrering av analytten.
- Validering av metoden

4. Teori

4.1 Hypokretin

Hypokretin er fellesnavnet for to eksitatoriske neuropeptider som ble oppdaget på slutten av 1990-tallet. To forskningsgrupper fant peptidene samtidig og går derfor under to forskjellige navn, henholdsvis hypokretin og orexin [8, 9]. I denne oppgaven vil peptidet omtales som hypokretin. Peptidene stammer fra precursorproteinet preprohypokretin som gjennom proteolyse danner hypokretin-1 og hypokretin-2.

Hypokretinene produseres kun av en liten gruppe nevroner lokalisert i den laterale hypothalamus [9, 10]. Figur 4-1 [11] viser peptidene som ligander for hypokretin-reseptor-1 og -2 som begge er G-proteinkoblede reseptorer [9]. Mens hypokretin-1 har affinitet til begge reseptortypene, binder hypokretin-2 seg hovedsakelig til hypokretin-reseptor-2 [9]. Reseptorene er distribuert over store deler av hjernen [12].



Figur 4-1 Preprohypokretin danner hypokretin-1 og -2 ved proteolyse. Hypokretin-1 har affinitet til begge de g-proteinkoblede hypokretinreseptorene [11]. Figuren er modifisert.

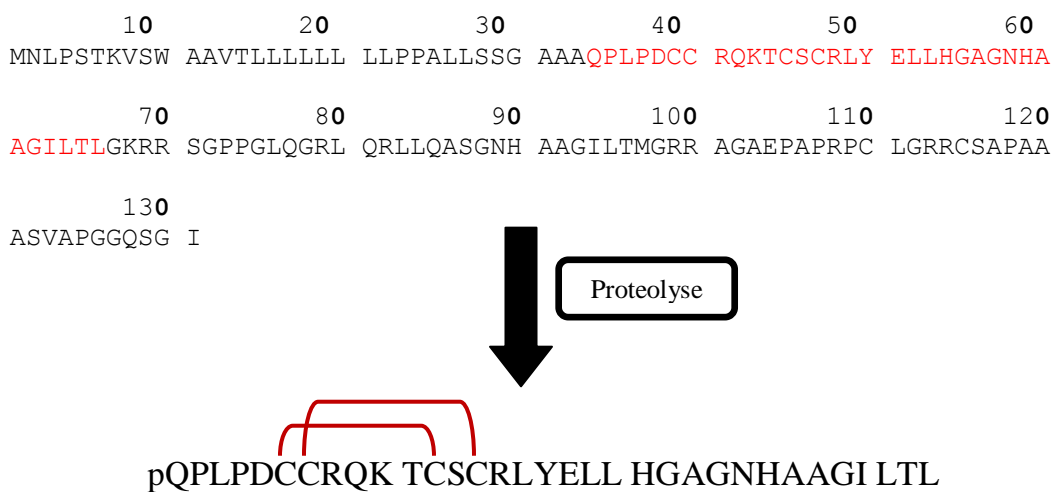
Hypokretinene ble først forbundet med regulering av appetitt da de kun produseres i den laterale hypothalamus som ofte blir kalt hjernens ”*feeding center*”. Forsøk gjort på mus og rotter støttet denne teorien [9, 13-15]. Senere ble det funnet en sammenheng mellom hypokretiner og søvn. Man tror hypokretin-1 spiller en viktig rolle i å regulere menneskets søvn mønster. Det er for eksempel vist i mennesker og dyr at hypokretinmangel forbindes med narkolepsi [16, 17]. I denne oppgaven vil det fokuseres på hypokretin-1 da kun dette peptidet kan brukes som biomarkør for narkolepsi. Hypokretiner er i senere tid koblet opp mot en rekke andre prosesser blant annet som modulator for koordinasjon av følelser, hjernens belønningssystem og energihomeostase [11].

Konsentrasjonen av hypokretin-1 i spinalvæske varierer naturlig med søvnrytmen. Nevronene frigjør hypokretin i våken tilstand og reduseres ved søvn [18].

Hypokretin-1 spiller trolig en aktiverende rolle for monoaminerge nevroner som styrer søvn [11]. Lave nivåer under søvn, gjør at spinalvæskeprøver må tas på dagtid, helst mellom kl 14 og 16 for lettere å kunne skille mellom friske og kronisk lave hypokretin-1-nivåer.

4.1.1 Struktur

Hypokretin-1 kommer fra precursormolekylet preprohypokretin som er 131 aminosyrer langt. I figur 4-2 ser man hele preprohypokretin med hypokretin-1 i rødt (34-66). Hypokretin-1 består av 33 aminosyrer og har to disulfidbindinger som vist i figur 4-2. Aminosyrene arginin (R), histidin (H) og lysin (K) har basiske egenskaper og vil teoretisk gi hypokretin 6 positive ladninger ved fysiologisk pH. Pyroglutamat (pQ) som er den terminale aminogruppen, danner en laktamring ved at karboksylgruppen binder til α -aminogruppen og gir derfor ingen ladning.



Figur 4-2 Figuren viser hele aminosyrekjeden til preprohypokretin (over). Hypokretin-1 (34-66) er merket med rødt. Disulfidbindingene mellom cystein (C) er merket med røde streker (under).

4.2 Cerebrospinalvæske

Som omtalt tidligere måles hypokretin-1-nivåer i cerebrospinalvæske (CSF). CSF er en vandig, gjennomsiktig og svakt basisk væske med pH 7,3 [19]. Et voksent menneske har spinalvæskevolum på ca. 140 mL som sirkulerer gjennom sentralnervesystemet. Hjernen produserer kontinuerlig CSF, gjennomsnittlig 0,3 - 0,4 mL/min [19, 20].

Sammensetning

CSF består hovedsakelig av vann; hele 99 %. Proteiner, salter og glukose står for den siste prosenten. De fleste salter og proteiner i plasma passerer over i CSF og gjør at man finner mange likhetstrekk mellom de to biologiske væskene. I normal CSF stammer 80 % av proteinene fra plasma, mens 20 % er syntetisert i hjernen [21]. Glukose- og saltkonsentrasjoner avviker i liten grad fra serumverdiene [19]. Proteininnholdet derimot er betydelig lavere enn i serum (tabell 4-1). CSF har mindre enn 1 % av proteininnholdet i serum.

Tabell 4-1 Sammensetning av cerebrospinalvæske og serum [19].

	CSF	Serum
Total protein	0,15-0,50 g/L	44-76 g/L
Glukose	2,7-4,0 mmol/L	4,0-6,0 mmol/L
Salter	> 150 mmol/L	150 mmol/L

Analyse av CSF

Det er flere utfordringer ved CSF som biologisk matriks. Innhenting av prøver er komplisert da det må utføres spinalpunksjon. CSF tappes gjennom en nål stukket inn i korsryggen. Dette må utføres av trenet helsepersonell og forbindes med store smerter. Prosedyren medfører en risiko for blodkontaminasjon [21]. Prøvevolumet er kun noen få mL, noe som fører til begrensninger for oppkonsentrering av analytter.

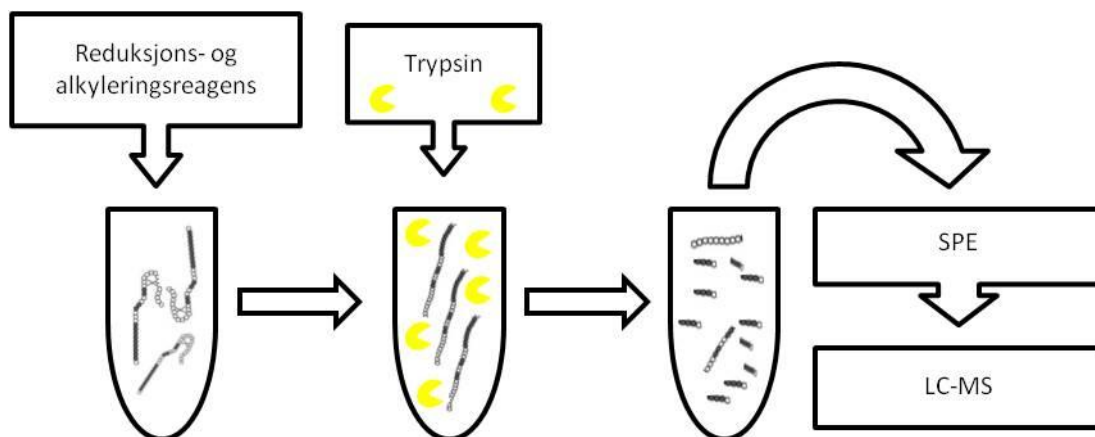
Litteratur viser at en rekke prøveopparbeidelsesmetoder kan benyttes for å ekstrahere proteiner fra CSF. Ultrafiltrering, proteinfelling og SPE er alle testet ut med gode utbytter [22, 23].

4.3 Prøveopparbeidelse

For å analysere hypokretin-1 i CSF er benyttet flere teknikker. Disser er omtalt nedenfor.

4.3.1 Tryptisk klipp

Trypsin brukes mye i proteomikk der man gjerne arbeider med proteiner og store pepitder som vanskelig lar seg analysere med LC-MS. Trypsin konverterer større proteiner til analyserbare peptidblandinger. Figur 4-3 gir en oversikt over de forskjellige trinnene til tryptisk klipp.



Figur 4-3 Tryptisk klipp. I første trinn brukes man reduksjons- og alkyleringsreagens til å fjerne disulfidbindinger. Peptidene endrer struktur som gjør det lettere for trypsin å nå klippepunktene. I neste trinn tilsettes trypsin. Trypsin klipper peptidet til mindre aminosyrekjeder før blandingen gjennomgår SPE før den analyseres med LC-MS.

Trypsin er en protease som klipper aminosyrekjeder på C-terminal side av Lysin og Arginin, med unntak når Prolin er neste aminosyre i sekvensen [24]. Svært ofte er

avstanden mellom Lysin og Arginin i proteiner gunstig da lengden på peptidene som dannes er velegnet analyse med LC-MS [25].

Før den enzymatiske klippingen utføres ofte denaturering av proteinet etterfulgt av reduksjon og alkylering. Reduksjonsmiddelet fjerner bindingen og alkyleringsmiddelet setter på en alkyl-gruppe som blokkerer for gjendanning av sulfidbindingen. Disse trinnene er ikke alltid nødvendige, for eksempel for mindre proteiner og peptider som ikke inneholder aminosyre cystein. For hypokretin-1 som har fire cystein og dermed to disulfidbindinger kan det med fordel utføres, for å få en så fullstendig klipp som mulig. Disulfidbindinger skaper ofte en sekundærstruktur som hindrer proteasen i å nå bindinger. Resultatet blir en ufullstendig klipp og eventuelle variasjoner som kan skape unøyaktigheter i analysen.

4.3.2 Proteinfelling

Proteinfelling er en enkel og rask form for prøveopparbeidelse. En del proteinholdige biologiske væsker kan ikke injiseres direkte i en HPLC. Proteiner kan felle ut i kolonnen og skape problemer for analysen og instrumentene. Proteiner kan enkelt fjernes fra prøveløsningen ved å bruke reagenser som feller proteiner. ACN, MeOH og trikloreddiksyre er de mest brukte fellingsreagensene. Prøveløsningen tilsettes en proteinfellingsreagens og sentrifugeres. Proteinene feller ut og supernatanten tas ut å injiseres i HPLC eller bearbeides videre [26].

Proteinfelling er en enkel og rask prøveopparbeidelsesmetode som vanligvis gir gode utbytter, men fjerner ikke alle forurensninger og må ofte kombineres med andre former for prøveopparbeidelse.

4.3.3 Ultrafiltrering

Ultrafiltrering baserer seg på å fraksjonere molekyler fra en prøveløsning. Dette gjøres ved å la en prøveløsning passere gjennom en semipermeabel membran. Ved å bruke et filter laget av blant annet polyetersulfon (PES) kan man enkelt ekskludere

større molekyler som for eksempel plasmaproteiner. Porestørrelsen varierer ut i fra bruksområde. Prøveløsningen tilsettes en vial med filter i bunn (se figur 4-4). Løsningen sentrifugeres og prøveløsningen presses gjennom filteret. Den filtrerte løsningen analyseres eller bearbeides videre.



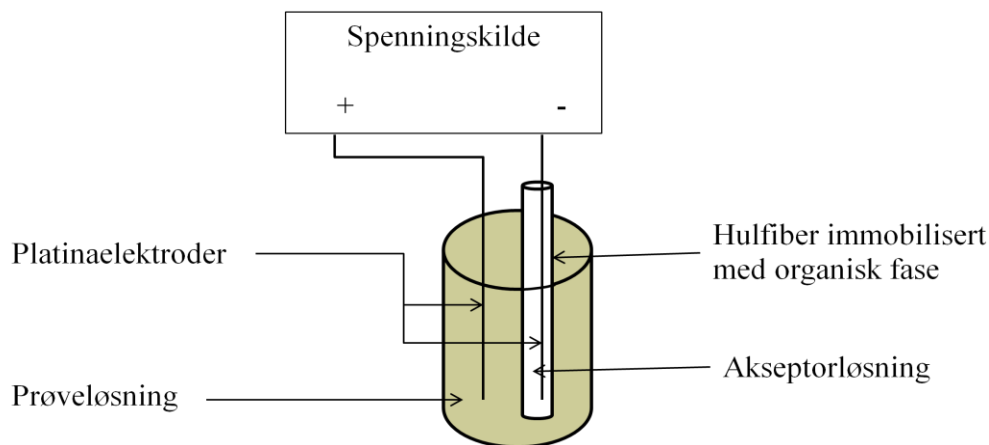
Figur 4-4 Bildet viser Ultrafilteringsrør av typen Vivaspin 500. Til venstre har man en vial med PES-membranfilter der prøveløsningen tilsettes. Til høyre har man plassert filterbeholderen i et oppsamlingsrør for den filtrerte løsningen (foto: www.vivaproducts.com).

4.3.4 Elektromembranekstraksjon (EME)

EME er en forholdsvis ny prøveopparbeidelsesmetode og er foreløpig lite brukt for ekstraksjon av peptider og proteiner fra biologiske matriser. Metoden er likevel interessant da den i løpet av få minutter gir gode utbytter med lavt forbruk av løsemidler [27, 28]. Den er også testet på peptider med lovende resultater [29].

EME er basert på elektrisk spenning og en pH-gradient som drivkraft for massetransport av analytt fra prøveløsning gjennom den kunstige membranen og over i akseptorfasen. Figur 4-5 viser en oversikt over oppsettet for EME. Systemet er bygget opp av en beholder til prøveløsningen, hulfibermembran og to elektroder. Den kunstige væskemembranen består av en porøs hulfiber dyppet i en organisk fase.

Akseptorløsningen tilsettes på innsiden av hulfiberen (lumen). Elektrodene er koblet til en likespenningskilde og settes ned i henholdsvis prøveløsningen og hulfiberlumen, på hver sin side av den kunstige væskemembranen. Det blir da dannet en elektrisk krets. Ladede partikler i prøveløsningen vil migrere over væskemembranen til elektroden i akseptorløsningen. Systemet er utsatt for kontinuerlig risting under prøveopparbeidelsen. Dette skal øke kontaktflaten til analytten og forbedre utbytte.



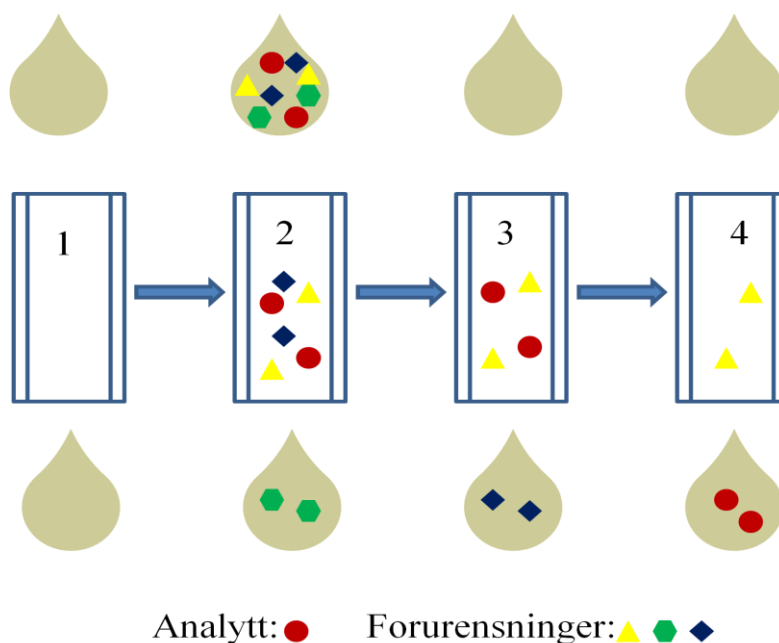
Figur 4-5 Oppsett av elektromembranekstraksjon.

Peptider som har positiv ladning i surt miljø, vil migrere fra den positive elektroden i prøveløsningen til den negative i akseptorløsningen. Akseptorløsningen er dessuten surgjort for at den skal kunne injiseres direkte i LC-MS.

4.3.5 SPE

Fast-faseekstraksjon (SPE) er mye brukt i analyse av biologiske væsker. Det er en enkel og relativt rimelig metode samtidig som den krever noe mindre løsemidler enn for eksempel proteinfelling. SPE er også kjent for å gi godt utbytte ved bruk av riktig stasjonærfase. SPE brukes først og fremst til rensing av prøver, men kan også gi rom for oppkonsentrering av analytten. Prinsippet for ekstraksjonen er stoffenes fordeling mellom stasjonærfase og væskefase. Stasjonærfasen består som oftest av porøse

partikler med aktive grupper på overflaten. Analytten bør helst, i motsetning til forurensningene, selektivt interagere med de aktive gruppene og retarderes på SPE-kolonnen. I oppgaven er det brukt omvendt fase for ekstraksjonen da hypokretin-1 er hydrofobt molekyl og vil danne van der Waalske interaksjoner med hydrofobe grupper i stasjonærfasen.



Figur 4-6 Figuren viser de fire trinnene for SPE. 1) Kondisjonering, 2) prøvepåsetting, 3) vask og 4) eluering.

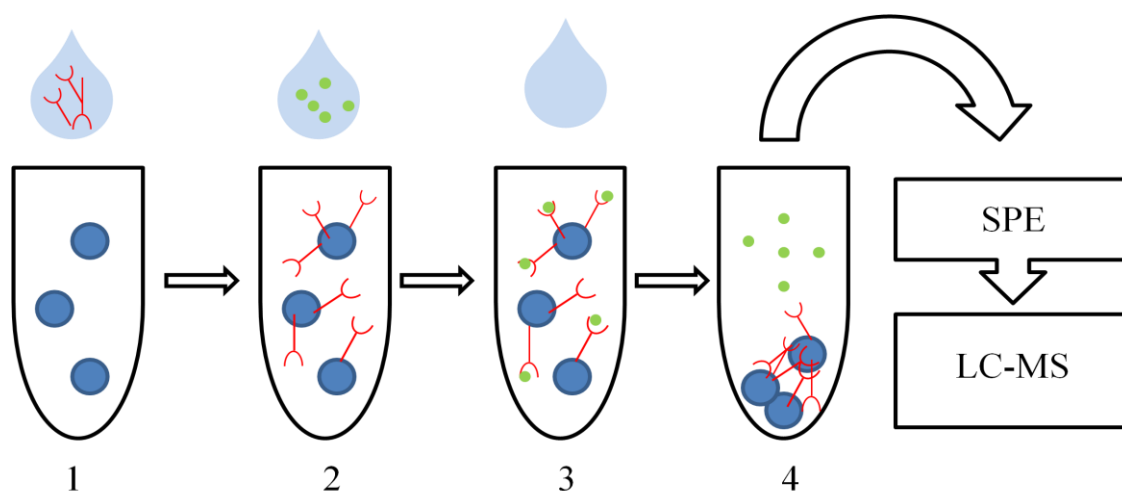
SPE består vanligvis av fire trinn (se figur 4-6):

- 1) **Kondisjonering.** For å aktivere sorbentens aktive grupper, presses først en løsning med høy løsemiddelstyrke gjennom kolonnen. Kolonnen klargjøres for videre bruk med en vaskeløsning med lav løsemiddelstyrke.
- 2) **Prøvepåsetting.** Prøveløsningen presses gjennom kolonnen. Sorbenten skal interagere med analytten som isoleres i kolonnen.
- 3) **Vask.** Vaskeløsningen skal ha en løsemiddelstyrke som gjør at den vasker ut forurensninger uten å bryte interaksjonen mellom analytt og stasjonærfase.

- 4) **Eluering.** En eluent er et løsemiddel som bryter interaksjoner mellom analytten og stasjonærfasen. Det er viktig at eluentens løsemiddelstyrke ikke er høyere enn nødvendig da forurensninger i kolonnen også kan skylles ut.

4.3.6 Immunoaffinitet

Immunoaffinitet er bygget på monoklonale antistoffers evne til å binde seg spesifikt til et antigen. Hvis man klarer å produsere et antistoff som binder seg spesifikt til en analytt (antigen), kan dette utnyttes til å rense opp en prøveløsning. Antistoffet binder seg til en del av antigenet som kalles epitop. Hvis epitopen forekommer hos andre molekyler i prøveløsningen, vil disse også danne interaksjoner med antistoffet. Antistoff med høy spesifisitet overfor analytten vil derfor gi de reneste prøvene.



Figur 4-7 Immunoaffinitet. Figuren viser hovedprinsippet til immunoaffinitet ved bruk av kuler. 1) Antistoffet tilsettes en suspensjon med kuler av typen protein G sepharose. 2) Etter å ha festet antistoffet til kulene og klargjort antistoffet, tilsettes prøveløsningen. 3) Peptidet fester seg til antistoffene og resten av prøveløsningen fjernes. En elueringsløsning som skal bryte interaksjonene mellom peptid og antistoff tilsettes. 4) Bindingene til antistoffene er brutt og løsningen med peptidet gjennomgår SPE før det analyseres med LC-MS.

Prosedyren kan utføres på flere måter. Antistoffet kan bindes til kuler som danner en suspensjon (se figur 4-7). Det er også mulig å produsere brønner der antistoffet kan

kobles til innsiden av brønnenes vegger. Grunnprinsippet er likevel det samme og kan oppsummeres i fire trinn.

- 1) Først må antistoffet klargjøres gjennom et **vasketrinn**
- 2) **Prøveløsningen tilsettes**. Det er nødvendig å riste blandingen for at antigen skal komme i kontakt og binde seg til antistoffene.
- 3) Når antigen har bundet seg til antistoffet, **fjernes prøveløsningen**.
- 4) Til slutt brukes en **elueringsløsning** som skal bryte interaksjonen mellom antigen og antistoff. Løsningen fjernes og kan analyseres eller eventuelt bearbeides videre.

Ved bruk av kuler, vil man få et trinn i forkant av prosedyren. Antistoffet må festes til kulene. Det er viktig å beregne et overskudd av antistoffene i forhold til analytten for å unngå metning og tap av utbytte.

4.4 Analyse med LC-MS

4.4.1 HPLC

HPLC-systemet består av to mobilfasereservoar, to pumper, en autoinjektor, en degasser og en separasjonskolonne. Mobilfasene går gjennom pumpene og blandes i blandekammeret. Ved gradienteluering, som er brukt i denne oppgaven, er pumpene programmert til gradvis å øke innholdet av organisk modifikator i mobilfasen. Ved omvendt fase-kromatografi, vil en økning i konsentrasjonen av organisk modifikator føre til at interaksjonene mellom analytt og stasjonærfase brytes, og analyttene elueres ut av kolonnen. Degasseren skal hindre at det kommer luft i systemet.

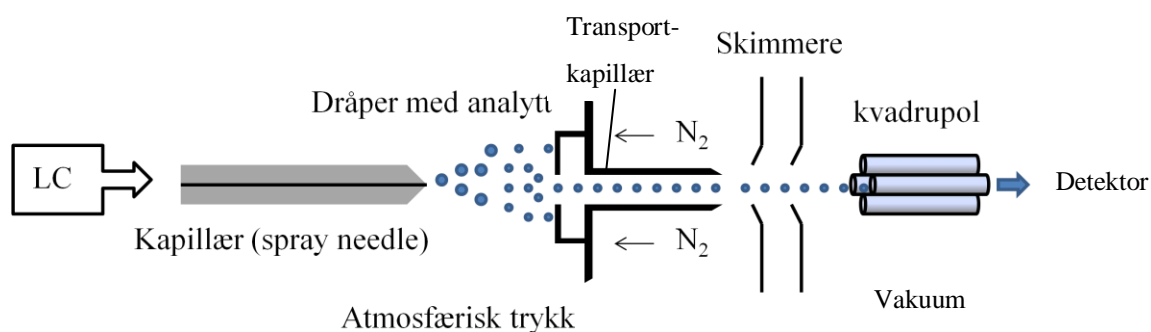
4.4.2 MS

Deteksjon med massespektrometri har vist seg svært effektiv innen peptidanalyser og proteomikk og får mye av æren for fremgangen fagfeltet har opplevd de siste tiårene [30]. Dette skyldes i hovedsak massespektrometerets sensitivitet, oppløsning, massenøyaktighet og evnen til å danne informasjonsrike ionespektra [30].

Et massespektrometer (MS) ioniserer molekyler for å danne elektrisk ladede molekyler eller molekylfragmenter som analyseres etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). MS-systemet har tre hovedbestanddelene: Ionekilde, masseanalysator og detektor. Ionekilden sørger for at molekylene får elektrisk ladning, masseanalysatoren separerer ionene etter masse-ladningsforholdet (m/z) og detektoren registrer mengden ioner som passerer masseanalysatoren.

Ionisering

Det finnes mange forskjellige ionekilder. De mest brukte er kjemisk ionisering (APCI) og elektrosprayionisering (ESI). APCI brukes i første rekke for upolare molekyler som vanskelig lar seg ionisere. ESI er foretrukket på sure og basiske komponenter som lar seg ionisere ved pH-justering. Da hypokretin-1 har flere basiske grupper ble det brukt ESI som ionekilde i denne oppgaven og denne metoden er beskrevet under.



Figur 4-8 Figuren gir en oversikt over ESI. Prøven presses gjennom kapillæret før spenning i kapillæret og forstøvergassen fører til dråpedannelse. Dråpestørrelsen reduseres til enkeltioner. Ionestrømmen fokuseres mot masseanalysatoren (kvadrupol) ved hjelp av skimmere og linser.

Figur 4-8 viser hvordan prøveløsningen kommer inn i et kapillær. I enden av kapillæret sørger spenning og forstøvergassen (N_2) for at væsken brytes opp til mindre dråper. Polariteten til spenningen avgjør om det blir dannet positivt eller negativt ladede dråper. Dråpenes størrelse blir ytterligere redusert i møte med tørkegassen. Videre øker ionenes frastøtning seg imellom inne dråpene. Ionefrastøtningen overgår overflatespenningen og såkalte Coulombeksplosjoner oppstår. Gjentatte eksplosjoner gjør at dråpestørrelsen gradvis reduseres til man har igjen enkeltioner. Figur 4-8 viser hvordan ionene passerer igjennom et transportkapillær før ionestrømmen fokuseres inn mot masseanalysatoren ved hjelp av skimmere og linser. Kapillæret har motsatt ladning i forhold til ionene som skal analyseres. Dette for å akselerere ionene. Trykket synker gradvis fra atmosfærisk trykk til nærmest vakuum mellom skimmere og linser (10^{-6} Torr).

ESI kan brukes i positiv og negativ modus ut i fra analyttens ladning. Positiv spenning gir positiv modus. ESI i positiv modus brukes som regel på peptider da de får positiv ladning ved sur pH. For proteiner og større peptider med flere ioniserbare grupper vil ESI gi flere ladninger $[M+nH]^{n+}$.

Masseanalysator

Masseanalysatoren som ble brukt i oppgaven var av typen singelkvadropol. En kvadropol består av fire parallelle metallsylindere tilsatt vekselspanning. Ionene strømmer inn mellom stavene og påvirkes av spenningen. Oppnås stabil resonans, vil ionene passere gjennom kvadropolen. Ustabile ioner vil kollidere med stavene. Hvilke ioner som er stabile avhenger av m/z -verdien og spenningen tillagt stavene. Masseanalysatorens selektivitet kan bestemmes ved å endre spenningen til stavene.

Deteksjon skjer etter at ionene har passert kvadropolen. Antall ioner for hver m/z -verdi beregnes og omtolkes til kromatogrammer og massespektra ved hjelp av en programvare.

For en singel MS finnes det to deteksjonsmuligheter: Full sveip (SCAN) og selektiv ionemonitorering (SIM). Ved SCAN detekteres alle m/z -verdier for et gitt intervall, mens SIM detekterer kun utvalgte m/z -verdier. I denne oppgaven er begge deteksjonsmetodene brukt.

5. Materialer og metoder

5.1 Peptider, kjemikalier og utstyr

Tabellene 5-1 og 5-2 viser peptider/proteiner og kjemikalier brukt under eksperimentene. Tabell 5-3 viser utstyr som ble brukt.

Tabell 5-1 Peptider og proteiner

Peptid/Proteiner	Kvalitet	Leverandør
Hypokretin-1 (Orexin-A)	99,7 %	Enzo, Life Sciences
Trypsin fra bovin pankreas	Essensielt saltfri (frysetørket)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Antistoff for hypokretin-1	Ikke angitt	Oslo Universitetssykehus, Ullevål

Tabell 5-2 Kjemikalier

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril	$\geq 99,9 \%$	VWR International, BDH Prolabo, EC
Ammonium	$> 25 \%$	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat	$\geq 99,5 \%$	Fluka, Tyskland
DMP	Ikke angitt	Sigma-Aldrich, Sveits
DTT	$\geq 99,0 \%$	Fluka, India
Eddiksyre	$\geq 99,8 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim Tyskland
Etanolamin	$\geq 98,0 \%$	Fluka, Steinheim, Tyskland
Eugenol		Sigma-Aldrich, Steinheim Tyskland
Glycin	$\geq 99,7 \%$	Merck, Darmstadt, Tyskland
IAA	$\geq 99,0 \%$	Sigma-Aldrich, Norge
Invitrogen Dynabeads M-280 Tosylactivated		Invitrogen
Maursyre	$\geq 98,0 \%$	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol	$\geq 99,7 \%$	VWR International, BDH Prolabo, EC
Natriumklorid	$\geq 99,5 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

1-oktanol	> 99,0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Serum, humant		Oslo Universitetsykehus, Ullevål
Sitronsyre	Pro analyse	VWR
TFA	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	> 99,0 %	Fluka, Sveits
Trietanolamin	≥ 99,0 %	Fluka
Urea	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Vann	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland

Tabell 5-3 Utstyr

Utstyr	Modell	Produsent
LC-MS:		
Pumper	LC-10AD	Shimadzu, Kyoto, Japan
MS	LCMS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
System controller	SCL-10A <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Auto injector	SIL-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kolonne	Biobasic C8, 50mm x 5µm	Thermo Electron Corporation, Cheshire, UK
Programvare	LCMSsolution 2.04-H3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Øvrig utstyr:		
Empore C8	Empore Extraction Disks Octadecyl (C8) 47 mm	Teknolab, Norge
Empore C18	Empore Extraction Disks Octadecyl (C18) 47 mm	Teknolab, Norge
Eppendorf , LoBind	Protein LoBind, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Insert vial polypropylen	Target PP Polyspring	VWR International, BDH Prolabo, EC
Insert vial	Micro-insert 0,1 mL clear glass	VWR
Insert vial	Micro-insert 0,1 mL silanisert glass	VWR
Glass Pasteurpipette	150 mm	VWR

Pipettespisser	Finntip [®]	Thermo Labsystems, Helsinki, Finland
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph, Tyskland
pH-meter	826 pH mobile, 827 pH lab	Metrohm, Sveits
Ultrafilteringsrør	Vivaspin 500 (5 og 10 kDA)	VWR International, BDH Prolabo, EC
Ultralydbad	Branson 5510	VWR
Sentrifuge (stor)	Eppendorf Centrifuge 5804	VWR
Sentrifuge (liten)	Galaxy Mini Centrifuge	VWR, Korea
Vannrenseanlegg	EASYPure UV	Barnstead Storage System, USA
Vortex mixer	IKA MS 3 digital	Fisher Scientific, Norge
Vekt	XS205 Dualrange	Mettler Toledo, AS, Norge
Automatpipetter	Finnpipette [®]	Thermo Labsystems, Helsinki, Finland

5.2 Tillaging av løsninger og buffere

5.2.1 Hypokretinløsninger

Det veies inn 1,0 mg hypokretin-1 som løses i 1 mL vann. Ved hjelp av automatpipette ble løsningen fordelt i LoBind eppendorfrør. Det ble laget 60 enheter på 10 µL og 4 enheter på 100 µL, begge med konsentrasjonen 1 mg/mL. Enhetene ble frosset ned og lagret ved -32 °C.

Standarder

Standard lages ferskt før hver kjøring. Et LoBind eppendorfrør som inneholder 10 µL 1 mg/mL hypokretin-1 tas ut av fryser og tines i romtemperatur. Det tilsettes 990 µL mobilfase A eller 25 % ACN i 20 mM maursyre. Løsningen blandes på vortexmixer på lav hastighet før løsningen fortynnes videre til ønsket konsentrasjon.

5.2.2 Surrogatmatriks

Det ble laget 50 mL surrogatmatriks. Først tilsettes 1 mL humant serum en målekolbe før kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann. Løsningen ble lagret i kjøleskap ved +4 °C. Ny løsning ble laget ca. en gang per måned.

5.2.3 Løsninger til tryptisk klipp

Hypokretin-1

Det tines 10 µL 1 mg/mL hypokretin-1-løsning og tilsettes ionebyttet vann til 1 mL til konsentrasjon 10 µg/mL. Det overføres 100 µL til et LoBind eppendorfrør med 900 µL ionebyttet vann. Dette gir en konsentrasjon av hypokretin-1 på 1 µg/mL. Til slutt pipetteres 50 µL over i LoBind eppendorfrør som settes på is.

ABC-buffer 50 mM

Det veies inn 40 mg ABC som videre løses i 10 ml ionebyttet vann. Løsningen settes på is.

1 mM DTT

Det veies inn 1,55 mg DTT som løses i 1 ml ABC-buffer. Det tas ut 100 µL av løsningen som tilsetts 900 µL ABC-buffer. Dette gir en konsentrasjon på 1 mM DTT. Løsningen settes i kjøleskap (+4 °C).

5 mM IAA

Det veies inn 9,3 mg IAA som settes direkte i fryser (-32 °C). IAA tas ut 5 minutter før bruk. Det løses 9,3 mg IAA i 1 ml kald ABC-buffer (50 mM). Videre tas det ut 100 µL fra 50 mM-løsningen som tilsettes 900 µL kald ABC-buffer. Dette ga en konsentrasjon på 5 mM IAA.

Trypsin

Beregning av mengde trypsin:

Mengde peptid i hver prøve: $1 \mu\text{g/mL} \times 0,050 \text{ mL} = 0,050 \mu\text{g} = 50 \text{ ng}$ hypokretin-1

Trypsin tilsettes i forholdet 1/40: $50 \text{ ng} / 40 = 1,25 \text{ ng}$ trypsin

Det veies inn 1,25 mg trypsin. Videre løses 1,25 mg trypsin i 1 ml ABC-buffer som gir konsentrasjonen 1,25 mg/mL.

Det tas ut 10 µL av løsningen og tilsettes 990 µL ABC-buffer. Dette gir en konsentrasjon på 12,5 µg/mL. Deretter tas det ut 100 µL fra 12,5 µg/mL-løsningen og tilsettes 900 µL ABC-buffer til konsentrasjonen 1,25 µg/mL. Til slutt tas det ut 100 µL fra 1,25 µg/mL-løsningen og tilsettes 900 µL til konsentrasjonen 125 ng/mL.

Da 10 µL tilsettes prøveløsningen blir mengden trypsin riktig:

$$10 \text{ µL} \times 125 \text{ ng/mL} = 1,25 \text{ ng trypsin}$$

5.2.4 Løsninger til ultrafiltrering

Det tines 10 µL 1 mg/mL hypokretin-1-løsning som tilsettes 990 µL mobilfase A. Dette gir konsentrasjonen 10 µg/mL. Det tas ut 100 µL fra denne løsningen og tilsettes 900 µL mobilfase A som igjen gir en konsentrasjon på 1 µg/mL.

5.2.5 Løsninger til SPE

20 mM maursyre

20 mM maursyre brukes i både kondisjonerings- og vasketrinnet. Løsningen lages i store volum og brukes ved behov.

En 500 ml målekolbe fylles omtrent halvfull med ionebyttet vann før det tilsettes 377 µL konsentrert maursyre (HCOOH). Målekolben etterfylles med ionebyttet vann til målestreken. Kolben ristes forsiktig.

Elueringsløsninger med MeOH

Det lages 10 mL av hver elueringsløsning.

25 % MeOH: 2,5 mL MeOH tilsettes 7,5 mL 20 mM maursyre

50 % MeOH: 5,0 mL MeOH tilsettes 5,0 mL 20 mM maursyre

75 % MeOH: 7,5 mL MeOH tilsettes 2,5 mL 20 mM maursyre

85 % MeOH: 8,5 mL MeOH tilsettes 1,5 mL 20 mM maursyre

95 % MeOH: Se mobilfase B

Elueringsløsninger med ACN

Det ble laget 10 mL av hver elueringsløsning.

15 % ACN: 1,5 mL ACN tilsettes 8,5 mL 20 mM maursyre

25 % ACN: 2,5 mL ACN tilsettes 7,5 mL 20 mM maursyre

35 % ACN: 3,5 mL ACN tilsettes 6,5 mL 20 mM maursyre

50 % ACN: 5,0 mL ACN tilsettes 5,0 mL 20 mM maursyre

75 % ACN: 7,5 mL ACN tilsettes 2,5 mL 20 mM maursyre

95 % ACN: 9,5 mL ACN tilsettes 0,5 mL 20 mM maursyre

5.2.6 Løsninger til immunoaffinitet

Elueringsbuffer

0,1 M glycine

Det ble laget 50 mL løsning. Det veies først inn 0,375 g glycine som løses i en målekolbe tilsatt ionebyttet vann. Kolben etterfylles med ionebyttet vann til målestreken.

0,1 M glycine med 2 M urea, pH 2,9

Det lages 50 mL løsning. Det veies inn 0,375 g glycine og 6,007 g urea veies inn og løses i en målekolbe med litt ionebyttet vann. Kolben fylles nesten til målestreken med ionebyttet vann. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann.

2,5 % eddiksyre

Det ble laget en 50 mL løsning. En målekolbe fylles med litt ionebyttet vann før det tilsettes 1,25 mL konsentrert eddiksyre. Kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann.

0,1 M Sitronsyre

Det ble laget en 50 mL løsning. Det veies inn 105,1 mg sitronsyre som løses i en målekolbe med litt ionebyttet vann. Kolben etterfylles med ionebyttet vann til målestreken.

0,1 M ammoniumhydroksyd

Det ble laget en 50 mL Løsning. Det fylles med litt ionebyttet vann før det tilsettes 374 µL 25 % ammoniakkløsning. Kolben etterfylles med ionebyttet vann til målestreken.

Bindingbuffer

TBS

TBS består av 50 mM Tris og 150 mM NaCl, pH 7,5. Det lages 100 mL TBS. Det veies inn 6,055 g Tris og 8,766 g NaCl som tilsettes en målekolbe. Ionebyttet vann tilsettes, og stoffene løses opp. Vann tilsettes nesten til 100 mL. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann.

Vaskebuffer

TBS med 2M urea, pH 7,5

Det lages 50 mL vaskebuffer. Først veies det inn 6,007 g urea som løses i en målekolbe tilsatt TBS. TBS tilsettes nesten til 50 mL. pH justeres med 0,5 M HCl, og kolben etterfylles til målestreken med TBS.

Kryssbindingsbuffere

200 mM trietanolamin, pH 8,9

Det lages 200 mM trietanolamin. Først tilsettes 2,65 mL trietanolamin en målekolbe med litt ionebyttet vann. Vann tilsettes nesten til 100 mL. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann.

50 mM DMP i 200 mM trietanolamin

Løsningen lages fersk til hvert forsøk. Det lages 1,2 mL 50 mM DMP i 200 mM trietanolamin. Første veies det inn 15,55 mg DMP som løses i 1,2 mL 200 mM trietanolamin.

100 mM etanolamin, pH 8,9

Det lages 100 mL 100 mM etanolamin. Først tilsettes 601 µL etanolamin en målekolbe og kolben fylles nesten til 100 mL med ionebyttet vann. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben etterfylles til målestreken med ionebyttet vann.

5.2.7 Løsninger til LC-MS

20 mM maursyre

En målekolbe fylles omtrent halvfull med ionebyttet vann før det tilsettes 377 µL konsentrert maursyre (HCOOH). Målekolben etterfylles med ionebyttet vann til målestreken. Kolben ristes forsiktig.

Mobilfase A

MeOH og 20 mM maursyre i blandingsforhold 5:95 (v/v).

Når man lager 500 mL mobilfase A tar man 25 mL MeOH og tilsetter 475 mL 20 mM maursyre. Løsningen settes på ultralydbad i 5 minutter før bruk i LC-MS.

Mobilfase B

MeOH og 20 mM maursyre i blandingsforhold 95:5 (v/v).

Når man lager 500 mL mobilfase B tar man 25 mL 20 mM maursyre og tilsetter 475 mL MeOH. Løsingen settes på ultralydbad i 5 minutter før bruk i LC-MS.

5.2.8 Utstyr til SPE

SPE-tips lages med en glasspipette som brukes til å trykke ut 6 små puter fra 3M EMPORE disks i C8 og C18-materiale. Putene overføres fra glasspipetten til bunnen av en 50 μ L eller 1.000 μ L pipettespiss ved å dytte det over med metalltråd med passende tykkelse. Figur 5-1 viser hvordan de seks putene trykkes forsiktig sammen ved hjelp av metalltråden. Pipettespissen stikkes ned i eppendorfrør med gjennomhullet i topplokk.



Figur 5-1 Bildet til venstre viser pipettespissen som fungerer som en SPE-kolonne. Metalltråden presser de små putene forsiktig sammen. Til høyre ser man kolonnen plassert gjennom et hull i lokket på et eppendorfrør.

5.3 Metoder til prøveopparbeidelse

5.3.1 Proteinfelling

Varierende konsentrasjoner av hypokretin-1 i fortynnet humant serum ble tilsatt 100 % ACN som fellingsreagens. Forholdet mellom prøvolum og fellingsreagens er 40:60 (v/v). 100 μ L prøve tilsettes 150 μ L ACN i et LoBind eppendorfrør og

sentrifugeres deretter i 10 minutter ved 10.000 rpm. Supernatanten (225 µL) pipetteres ut og dampes inn til tørrhet ved 60 °C/N₂ i ca 45 minutter. Prøven reløses i 50 µL mobilfase A og sentrifugeres i 10 minutter ved 10.000 rpm. 25 µL pipetteres ut og 20 µL injiseres i LC-MS.

5.3.2 Ultrafiltrering

Ultrafiltrering utføres på følgende måte: 400 µL av en vandig hypokretinløsning med konsentrasjon 1 µg/mL overføres til filtreringsrøret Vivaspin 500 med porestørrelse på hhv. 5 og 10 kDa. Prøven sentrifugeres i 15 minutter ved 15.000 rpm. Filtratet injiseres i LC-MS.

5.3.3 Elektromembranekstraksjon (EME)

Hypokretin skal transporteres fra en donorfase gjennom et organisk løsemiddel som er immobilisert i porene i en porøs fiber (hulfiber) til akseptorfasen inne i hulfiberlumen. Elektrisk potensial og pH-gradient driver ekstraksjonen. Ekstraksjonstiden er på 5 minutter.

Prøver

Det lages en vandig prøveløsning og en i surrogatmatriks.

- 1) Fra stamløsningen fortynnes hypokretin til 50 ng/mL med en 100 mM maursyreløsning.
- 2) Fra stamløsningen fortynnes hypokretin til 50 ng/mL med surrogatmatriks. Humant serum ble fortynnet med 20 mM maursyre for å sikre positiv ladning av peptidet.

En prøveløsning på 500 µL overføres til vialen. Hulfiber dyppet i den organiske fasen (1-oktanol og eugenol) fylles med akseptorløsningen (100 mM maursyre) og plasseres i brønnen. Spenningskilden settes på 25 V. Anoden settes i hulfiberlumen og katoden i brønnen med donorfase. Ekstraksjonen utføres ved risting i 5 minutter

ved 1350 rpm. Deretter pipetteres 20 µL av akseptorløsningen over i en polypropylenvial. Til slutt injiseres 15 µL i LC-MS.

5.3.4 Tryptisk klipp med SPE

Proteolyse av hypokretin med påfølgende SPE ble utført på følgende måte:

- 1) En prøveløsning på 50 µL 1 µg/mL hypokretin tilsettes 10 µL 1 mM DTT-løsning. Blandingen settes til risting ved 95 °C i 15 minutter.
- 2) Prøveløsningen avkjøles i romtemperatur før 10 µL 5 mM IAA tilsettes. Løsningen settes umiddelbart mørkt i 15 minutter.
- 3) En løsning 10 µL 125 ng/mL trypsin tilsettes. Løsningen settes i varmeskap ved 37 °C i 15-20 timer.

SPE-kolonnen er sammensatt av en pipettespiss à 50 µL med C8 pakkemateriale (se kapittel 5.2.8). Løsningene presses gjennom kolonnen ved hjelp av en sentrifuge satt til 5000 rpm i 3 minutter.

- 1) Kondisjonering med 100 µL 100 % MeOH og 100 µL 20mM HCOOH
- 2) Prøvepåsetting av 80 µL løsning
- 3) Vask med 50 µL 20 mM HCOOH
- 4) Eluering til nytt LoBind eppendorfrør med 50 µL mobilfase B
- 5) Dampes inn til tørrhet ved 60 °C/N₂ og reløses i 25 µL mobilfase A. 25 µL pipetteres over i polypropylenvial. 20 µL injiseres i LC-MS.

5.3.5 Immunoaffinitet med SPE

De første trinnene ble brukt til å feste antistoff til kuler:

- 1) Det tilsettes 25 µL løsning inneholdende kuler av typen Protein G sepharose i et LoBind eppendorfrør.
- 2) Bindingsbufferen 50 mM TBS (400 µL) tilsettes før løsningen ble sentrifugert ved 3.000 rpm i 1 minutt. Supernatanten fjernes før trinnet gjentas totalt tre ganger.

- 3) Det tilsettes 200 μL 5 $\mu\text{g/mL}$ antistoffløsning. Løsningen ble satt til risting i 30 minutter før den ble sentrifugert ved 3.000 rpm i 1 minutt for så å fjerne ubundet antistoff.
- 4) Det vaskes med 400 μL 50 mM TBS bindingsbuffer. Løsningen sentrifugeres ved 3.000 rpm i 1 minutt. Supernatanten fjernes.
- 5) Endrer buffer ved å tilsette 400 μL trietanolamin og sentrifugerer i 1 minutt ved 3.000 rpm.
- 6) Kryssbinding: Det tilsettes 400 μL DMP i trietanolamin. Løsningen settes til risting i 60 minutter og senere sentrifugeres ved 3.000 rpm i 1 minutt.
- 7) Vask med 400 μL trietanolamin og sentrifugeres ved 3.000 rpm i 1 minutt.
- 8) Blokk med 400 μL etanolamin og settes til risting i 15 minutter. Senere sentrifugeres løsningen ved 3.000 rpm i 1 minutt.
- 9) Ubundet antistoff fjernes med 400 μL elueringsbuffer (glycin 0,1 M m/2 M urea). Sentrifugerer ved 3.000 rpm i 1 minutt.
- 10) Vasker med 400 μL bindingsbuffer og sentrifugerer ved 3.000 rpm i 1 minutt. Trinnet gjøres totalt 2 ganger.

De neste trinnene omhandler prøveopparbeidelse med immunoaffinitet:

- 11) Binding av peptid ved å tilsette 200 μL hypokretin 250 ng/mL løst i bindingsbuffer. Løsningen settes til risting i 60 minutter og sentrifugeres i 1 minutt ved 3000 rpm.
- 12) Vask med 400 μL vaskebuffer TBS og sentrifugering ved 3.000 rpm i 1 minutt. Trinnet gjøres totalt 5 ganger.
- 13) Eluering med 200 μL 2,5 % eddiksyreløsning. Trinnet gjøres totalt 3 ganger.

Deretter utføres SPE:

- 1) Kondisjonering med først med 100 μL 100 % ACN og så med 100 μL 20 mM maursyre.
- 2) Prøvepåsetting. Eluatet fra punkt 13) tilsettes (200 μL x 3)

- 3) Vask med 50 μ L 20 mM maursyre
- 4) Eluering med 50 μ L 25 % ACN i 20 mM maursyre.

Eluatet overføres til en polypropylenvial og 20 μ L injiseres direkte i LC-MS.

5.3.6 SPE

SPE ble brukt på varierende konsentrasjoner av hypokretin i surrogatmatriks. SPE-kolonner av pipettespisser (50 – 1000 μ L) med C8 eller C18 pakkemateriale ble plassert i eppendorfrør med hull i topplokket (se kapittel 5.2.8). Løsningene ble presset gjennom kolonnen ved hjelp av en sentrifuge satt til 5000 rpm i 3 minutter.

Innledningsvis ble følgende SPE-metode brukt:

- 1) Kondisjonering med 100 μ L 100 % MeOH og 100 μ L 20 mM maursyre
- 2) Prøvepåsetting av 80 μ L løsning
- 3) Vask med 50 μ L 20 mM maursyre
- 4) Eluering til nytt LoBind eppendorfrør med 50 μ L mobilfase B
- 5) Dampes inn til tørrhet ved 60 °C/N₂ og reløses i 25 μ L mobilfase A. 25 μ L pipetteres over i polypropylenvial. 20 μ L injiseres i LC-MS.

Etter optimaliseringen ble følgende metode valgt for videre analyser av hypokretin-1 i surrogatmatriks:

- 1) Kondisjonering med 100 μ L 100 % ACN og 100 μ L 20 mM maursyre
- 2) Prøvepåsetting av 100-600 μ L analyttløsning
- 3) Vask med 50 μ L 20 mM maursyre
- 4) Eluering til nytt LoBind eppendorfrør med 50 μ L 25 % ACN i 20 mM maursyre
- 5) Eluatet pipetteres over i polypropylenvial. 20 μ L injiseres i LC-MS

5.4 Metoder for LC-MS

5.4.1 Oppsett av apparatur

Systemet består av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, degasser, separasjonsskolonne og MS-detektor. Ved proteinfelling brukes det i tillegg en forkolonne før separasjonsskolonnen.

5.4.2 HPLC

Tabell 5-4 viser betingelsene ved bruk av LC-MS.

Tabell 5-4 Betingelser for LC-MS

Injeksjonsvolum	15-20 µL
Væskeshastighet	50 µL/min
Kolonne	Biobasic C8, 50 mm x 5 µm
Forkolonne	BDS-Hypersil-C8 5 µm, 10 x 2,1 mm
Mobilfaser	Se kapittel 5.2.7

Ved oppstart av LC-MS-systemene vaskes autoinjektoren med 5 % MeOH i ionebyttet vann og pumpene med mobilfase A og B. Kolonnen ekvilibrerer i ca 30 minutter ved 50 µL/min, som er væskeshastighet under alle analyser.

Gradienter brukt på LC-MS

Tabellene viser de to gradientene for analysene på LC-MS (SQ). Tabell 5-5 viser gradienten brukt ved injeksjoner av analytt løst i mobilfase A. Tabell 5-6 viser gradient brukt ved injeksjoner av analytt løst i 25 % ACN i 20 mM HCOOH.

Tabell 5-5 Tabellen viser gradienten brukt ved analyser der analytten var løst i mobilfase A

<i>Tid (minutter)</i>	<i>Konsentrasjon mobilfase B (%)</i>
0	0
20	80
23	80
24	0
31	0
31	Stopp

Tabell 5-6 Tabellen viser gradienten brukt ved analyser der analytten var løst i 25 % ACN i 20 mM maursyre

<i>Tid (minutter)</i>	<i>Konsentrasjon mobilfase B (%)</i>
0	24
16	80
19	80
20	24
27	24
27	Stopp

5.4.3 MS

For SQ ble SIM-metoden brukt for de fleste analysene. Oversikt over betingelsene finnes i tabell 5-7. Tabell 5-8 og 5-9 viser teoretiske m/z -verdier for uklippet og klippet hypokretin-1.

Tabell 5-7 Tabellen viser betingelsene for MS (SQ)

ESI-mode	Positiv
Tørkegass	N ₂
Hastighet på tørkegass	1,5 L/min
Forstøvergass	N ₂
Kildespenning	4,5 V
Kapillærtemperatur	200 °C
Blokktemperatur	200 °C

Tabell 5-8 Tabellen viser teoretiske m/z-verdier med ladning for hypokretin-1 i surt miljø benyttet til å identifisere hypokretin-1 i analyse i scan- og SIM-mode [31].

m/z (mi)	Ladning	Sekvens
594.9616	+6	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
713.7524	+5	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
891.7524	+4	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
1188.9159	+3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
1782.8702	+2	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
3564.7331	+1	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>

Tabell 5-9 Tryptisk klipp. Tabellen viser teoretiske m/z-verdier med ladning, peptidsekvens og antall "missed cleavages" for klippeprodukter av hypokretin-1 som ble benyttet ved analyse i scan- og SIM-mode [31]

m/z (mi)	Ladning	Start	Slutt	Miss.cl.	Sekvens
275.7950	+3	9	15	1	(R) <u>QKTCSCR</u> (L)
285.1122	+2	11	15	0	(K) <u>TCSCR</u> (L)
390.8513	+3	1	10	1	(-) <u>uPLPDCCRQK</u> (T)
413.1889	+2	9	15	1	(R) <u>QKTCSCR</u> (L)
430.9401	+4	1	15	2	(-) <u>uPLPDCCRQKTCSCR</u> (L)
457.6966	+2	1	8	0	(-) <u>uPLPDCCR</u> (Q)
534.6788	+5	9	33	2	(R) <u>QKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
569.2170	+1	11	15	0	(K) <u>TCSCR</u> (L)
574.2511	+3	1	15	2	(-) <u>uPLPDCCRQKTCSCR</u> (L)
585.7734	+2	1	10	1	(-) <u>uPLPDCCRQK</u> (T)
594.9616	+6	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
604.0583	+4	11	33	1	(K) <u>TCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
621.6756	+3	16	33	0	(R) <u>LYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
668.0967	+4	9	33	2	(R) <u>QKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
713.7524	+5	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
805.0753	+3	11	33	1	(K) <u>TCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
825.3706	+1	9	15	1	(R) <u>QKTCSCR</u> (L)
860.8729	+2	1	15	2	(-) <u>uPLPDCCRQKTCSCR</u> (L)
890.4599	+3	9	33	2	(R) <u>QKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
891.9387	+4	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
914.3859	+1	1	8	0	(-) <u>uPLPDCCR</u> (Q)
932.0098	+2	16	33	0	(R) <u>LYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
1170.5394	+1	1	10	1	(-) <u>uPLPDCCRQK</u> (T)
1188.9159	+3	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
1207.1094	+2	11	33	1	(K) <u>TCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
1335.1862	+2	9	33	2	(R) <u>QKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
1720.7386	+1	1	15	2	(-) <u>uPLPDCCRQKTCSCR</u> (L)
1782.8702	+2	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>
1863.0123	+1	16	33	0	(R) <u>LYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
2413.2115	+1	11	33	1	(K) <u>TCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
2669.3650	+1	9	33	2	(R) <u>QKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u> (-)
3564.7331	+1	1	33	3	<u>uPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL</u>

6. Resultater og diskusjon

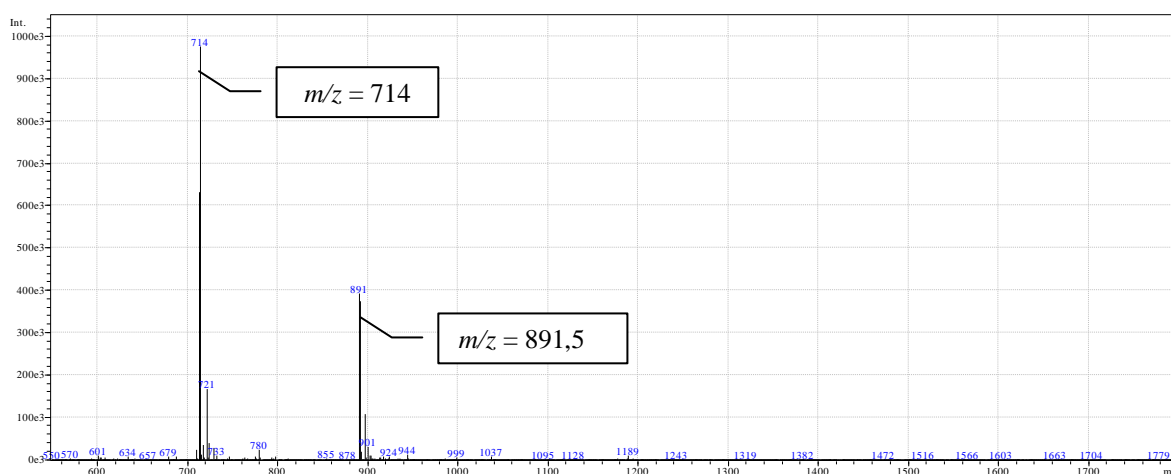
6.1 Metode for analyse av hypokretin-1

Ved utvikling av en ny LC-MS-analysemetode for hypokretin-1, ble det tatt utgangspunkt i en eksisterende metode brukt på peptidet neurotensin. Dette var en gradienteluering med ACN som organisk modifikator. Mobilfasene ble laget med MeOH og ikke ACN. Siden MeOH har lavere løsemiddelstyrke enn ACN, måtte gradienten gjøres brattere. Begrunnelsen for dette er at man ønsket å være sikker på at de hydrofobe interaksjonene med stasjonærfasen ble brutt og at peptidet ble eluert ut av kolonnen.

6.2 Initielle eksperimenter

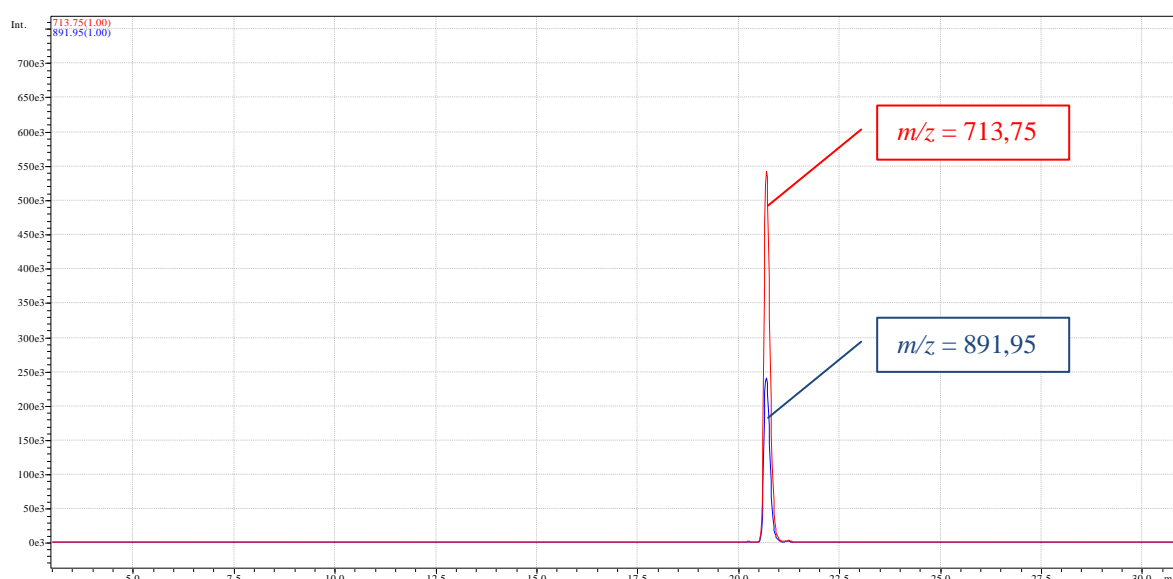
Innledningsvis ble det undersøkt om hypokretin-1 løst i vann lot seg detektere med LC-MS-metoden og om man eventuelt kunne oppnå bedre signalintensitet ved å utføre tryptisk klipp av peptidet til mindre aminosyrekjeder.

6.2.1 Hypokretin-1 i vann



Figur 6-1 Injeksjon av 10 $\mu\text{g/mL}$ hypokretin-1 i ionebyttet vann i LC-MS satt i scan-mode. Figuren viser et massespektrum med m/z -verdiene i ved $t_R=20,8$ minutter som ga den høyeste toppen på kromatogrammet.

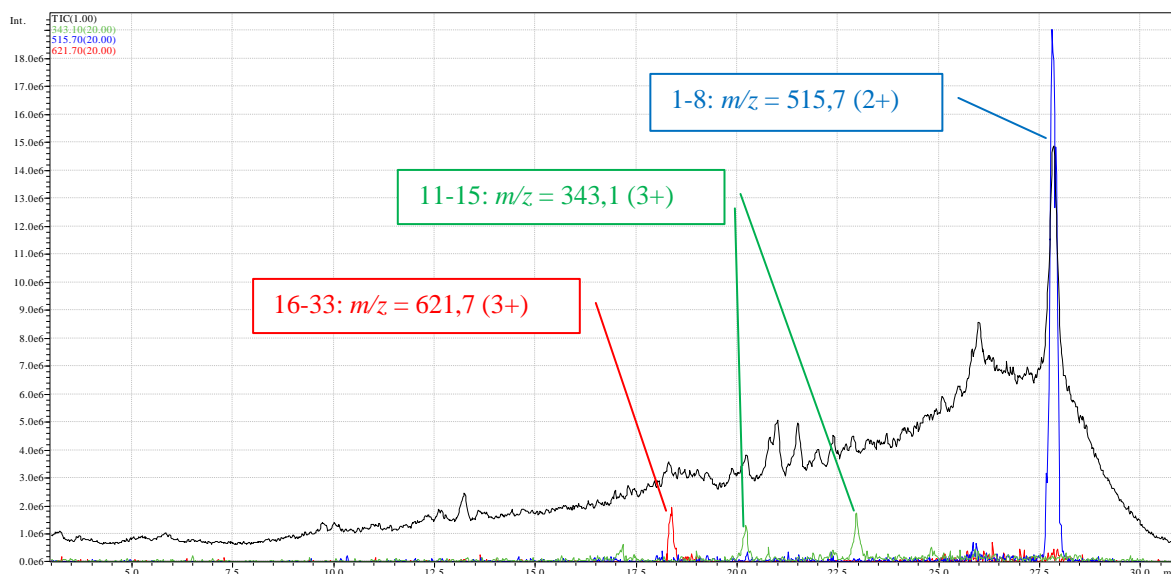
Første steg var å utføre analyse av hypokretin-1 i vandig miljø ved hjelp av LC-MS. Det ble ikke utført tryptisk klipp på forhånd. Målet var å se hvorvidt hypokretin-1 lot seg identifisere i ionebyttet vann. Dette fordi hypokretin-1 ble oppgitt å være godt løselig i vann. Figur 6-1 viser første analyse i scan-mode. Det ble registrert høyest intensitet på $m/z = 713,8$ og 892 som var i samsvar med de teoretiske verdiene for verdien for hypokretin-1 med henholdsvis 4 og 5 positive ladninger [31]. En ny analyse ble utført i SIM-mode på de nevnte m/z -verdiene (se figur 6-2). $m/z = 713,75$ og $891,95$ ble valgt for videre analysemetoder.



Figur 6-2 Figuren viser et kromatogram av 10 µg/mL hypokretin-1 i vann i SIM-mode. Toppene kommer ved $t_R=20,7$ minutter.

6.2.2 Tryptisk klipp av hypokretin-1

Trypsin ble brukt for å omdanne peptidet til kortere aminosyrekjeder som eventuelt kunne gi bedre signalstyrke ved analyse med LC-MS. Denne prosessen kalles proteolyse. Det ble brukt en reduserende reagens (DTT) og et alkyliserende reagens (IAA) for å sørge for at proteolysen ble så fullstendig som mulig. Valget av trypsin som protease ble gjort av tilgjengelighet og enzymets spesifisitet.



Figur 6-3 Tryptisk klipp av 50 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ hypokretin-1 i scan-mode. Figuren viser identifiserbare klippeprodukter. Blå: Sekvensen 1-8 med $t_R = 27,8$ minutter. Grønn: Sekvensen 11-15 med $t_R = 20,2$ og $22,9$ minutter. Rød: Sekvensen 16-33 med $t_R = 18,3$ minutter. Alle sekvensene er forstørret 20 ganger.

Tryptisk klipp av hypokretin-1 ble utført for å sammenligne intensiteten til produktene med det uklippede peptidet. Det ble på forhånd funnet teoretiske klippeprodukter for peptidet (se tabell 4-9). Først ble det utført en analyse av klippeproduktene i scan-mode (figur 6-3). Det ble identifisert flere mulige produkter og det ble gjennomført en ny analyse i SIM-mode (tabell 6-1). Det ble valgt m/z -verdier fra funn i scan-analysen samt fra teoretiske klippeprodukter.

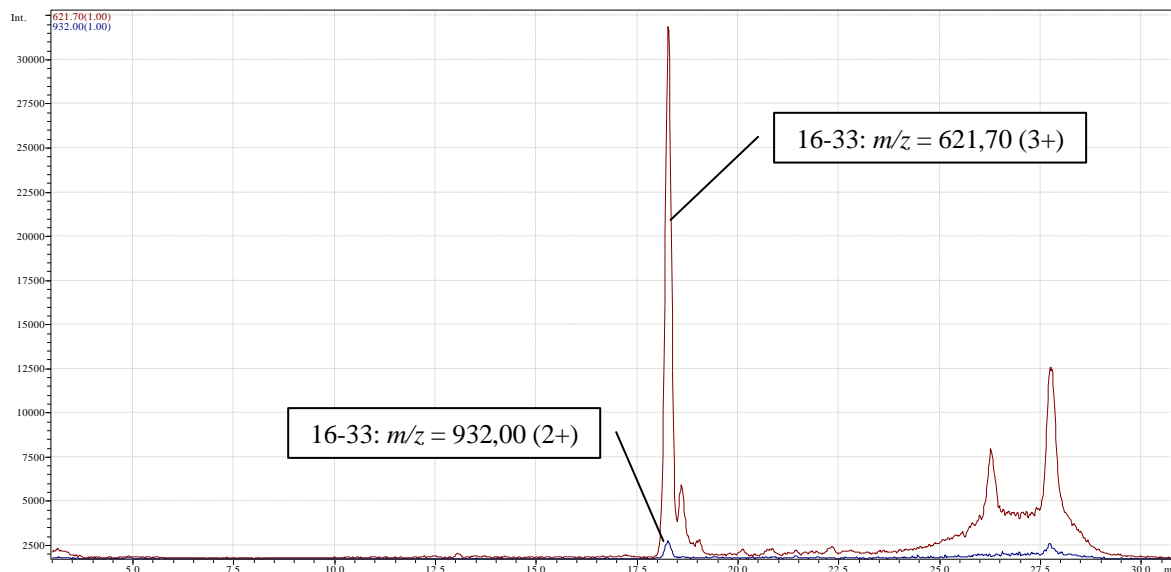
Analysen i SIM-mode bekreftet mange av funnene i scan-analysen (se figur 6-4). Sekvensen 1-8 gir god intensitet, men elueres sent ($t_R = 27,7$ minutter). Til tross for topphøyden er det mye støy på grunnlinjen i området og man får en forholdsvis høy LOD (se figur 6-5). Sekvensen 11-15 gir to topper med forskjellig retensjonstid i kromatogrammet ved 3 positive ladninger. Sekvensen lengde er i korteste laget. Ideelt sett ønsker man å arbeide med større klippeprodukter i området 6-20 aminosyrer [25]. Et annet klippeprodukt som ser ut til å kunne brukes er sekvensen 16-33. Det 18 aminosyrer-lange produktet gir god intensitet ved $t_R = 18,3$ minutter. Dette

underbygges også at både $m/z = 621,7$ (3+) og $932,0$ (2+) har topper ved samme retensjonstid (figur 6-4).

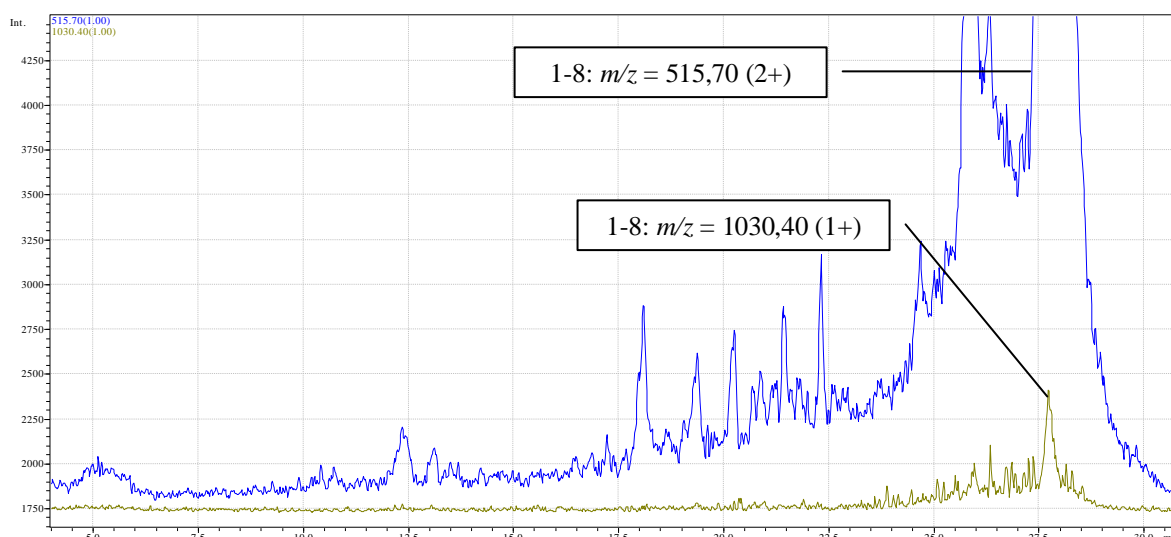
Tabell 6-1 Resultater fra tryptisk klipp av 50 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ hypokretin-1. Resultatene er basert på analyse utført på LC-MS i SIM-mode. Tabellen viser identifiserbare topper i kromatogrammene.

m/z	Start-end*	Mis.cl.*	Topp høyde	S/N ratio	t_R (min)
343,12 (3+)	11-15	0	49.285	352,04	20,2
343,12 (3+)	11-15	0	59.680	298,40	22,9
515,70 (2+)	1-8	0	502.840	317,85	27,7
621,68 (3+)	16-33	0	30.000	250,00	18,3
685,23 (1+)	11-15	0	43.780	109,45	27,7
932,01 (2+)	16-33	0	975	9,75	18,3
1030,40 (1+)	1-8	0	545	2,73	27,7

*Missed cleavage: Ufullstendig tryptisk klipp gir såkalt missed cleavage. Start-end beskriver hvor i det opprinnelige peptidet aminosyrekjeden starter og slutter.



Figur 6-4 Resultat tryptisk klipp av 50 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ hypokretin-1 i SIM-mode. Kromatogrammet viser sekvensen 16-33 med hhv 2 og 3 positive ladninger. $t_R = 18,3$ minutter.



Figur 6-5 Resultat tryptisk klipp av 50 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ hypokretin-1 i SIM-mode. Kromatogrammet viser grunnlinjen til sekvensen 1-8 med hhv 1 og 2 positive ladninger. $t_R = 27,7$ minutter.

Når man sammenligner signalintensitetene til 1-8- og 16-33-sekvensene og det uklipte peptidet, ser man at det uklipte peptidet gir best intensitet (se tabell 6-2). Dette kan skyldes at den tryptiske klippen ikke var fullstendig eller at noe forsvant under opprensningen med SPE. Ser man på senere forsøk med SPE gjort på hypokretin-1 løst i surrogatmatriks, kan SPEs lave utbytte forklare noe av forskjellen i signalintensiteten mellom uklippet peptid i vann og trypsinert peptid (se kapittel 6.3.6). En renere grunnlinje for hypokretin-1 i vann gir en lavere LOD sammenlignet med sekvensene 1-8 og 16-33.

Tabell 6-2 Tabellen sammenligner resultater fra analyser av hypokretin-1 i vann og sekvensene 16-33 og 1-8 fra tryptisk klipp av hypokretin-1. $n = 1$ for alle kjøringar.

	Hypokretin-1 i vann	Tryptisk klipp, sekvens 16-33	Tryptisk klipp, sekvens 1-8
Konsentrasjon	10 µg/mL	0,625 µg/mL	0,625 µg/mL
Oppkons.faktor	1	3,2	3,2
Topp høyde	962.443	30.000	505.318
S/N-ratio	19.249	250	318
LOD	1,56 ng/mL	24,0 ng/mL	18,9 ng/mL

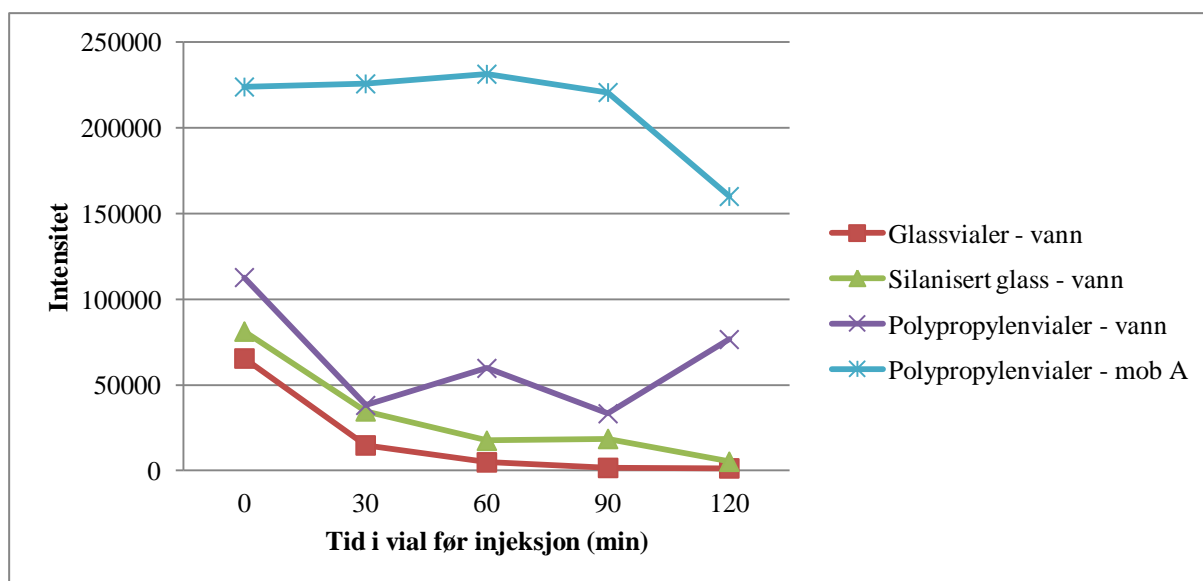
Forskjellen er stor nok til at man foreløpig velger å gå videre uten å bruke tryptisk klipp. Det ser ikke ut til å gi fordeler som høyere signalintensitet eller renere grunnlinje. I tillegg det tidsbesparende å kutte ut dette trinnet. Resultatene i tabell 6-2 er riktignok basert på enkeltforsøk, men disse ble bekreftet ved senere eksperimenter.

6.2.3 Stabilitet av hypokretin-1 i vann

Etter en rekke analyser ble det oppdaget stor variasjon i signalintensiteten. Spesielt vandige prøver ga lav intensitet med stor variasjon. Mange peptider og proteiner regnes som aggregerende eller adsorberende til glass og plast. Dette er et velkjent problem. Siden eppendorfrør av LoBind-kvalitet ble brukt under fortynning og prøveopparbeidelse, ble fokus rettet mot glassvialene brukt i LC-MS-analysen.

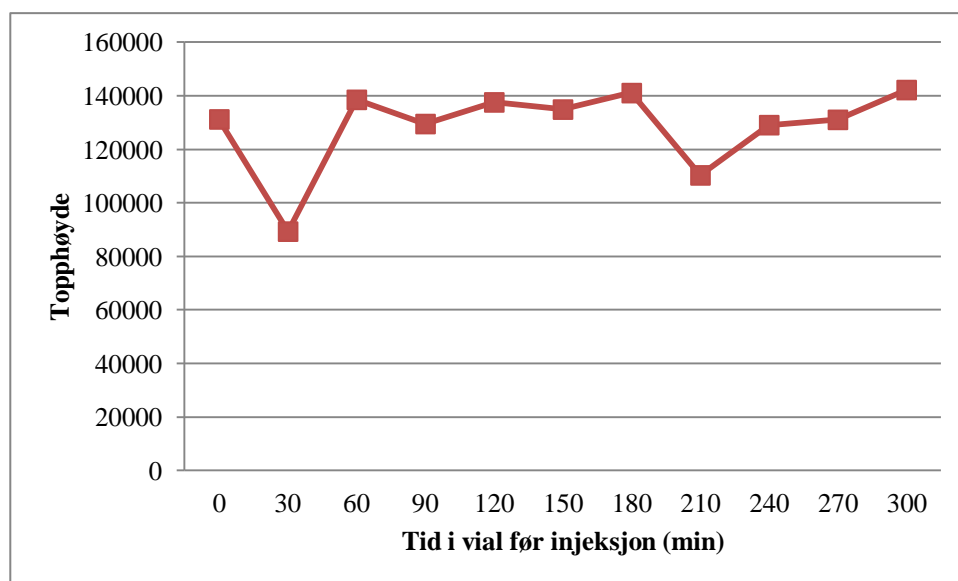
Valg av vialer til analyse

Først ble det gjennomført et forsøk som så på signalintensitet over tid. Det ble foretatt gjentatte injiseringer fra vialer med 720 ng/ml hypokretin-1 løst i vann. Figur 6-6 viser signalintensiteten for hypokretin-1 fra 3 ulike vialtyper.



Figur 6-6 Figuren viser intensitet i forhold til tid ved injeksjoner av 20 μ L 720 ng/mL hypokretin-1 i henholdsvis vann og mobilfase A. Analysene er gjort på samme prøveløsning/vial. Tiden på x-aksen viser tid fra prøven ble dispensert på vial til LC-MS-analysen startet.

For prøven løst i vann og oppbevart på glass viste det seg at signalintensiteten sank drastisk etter en halv time og fortsatte videre nedover. Ved injeksjonen etter 120 minutter ble det oppnådd 2 % av intensiteten til den første injeksjonen. Dette kunne tyde på at glassvialene var årsaken til variasjonen. Silaniserte glassvialer ble derfor forsøkt for å se om dette kunne hindre interaksjon med glassveggene. Tendensen var den likevel den samme. Ved bruk av polypropylenvialer (*Target PP Polyspring*) fikk man stor variasjon i signalintensiteten, men ingen like tydelig nedadgående trend. Først ved fortynning av hypokretin-1 i mobilfase A og senere analyse ved polypropylenvialer fikk man en stabil og høyere signalintensitet. Selv om man i figur ser man en dupp etter 120 minutter, ble dette senere avkreftet ved ny analyse på 300 minutter (figur 6-7).



Figur 6-7 Figuren viser langtidstest (300 minutter) av 500 ng/mL hypokretin-1 løst i mobilfase A. Analysene er gjort på samme prøveløsning/vial. Tiden på x-aksen viser tid fra prøven ble dispersert på vial til LC-MS-analysen startet.

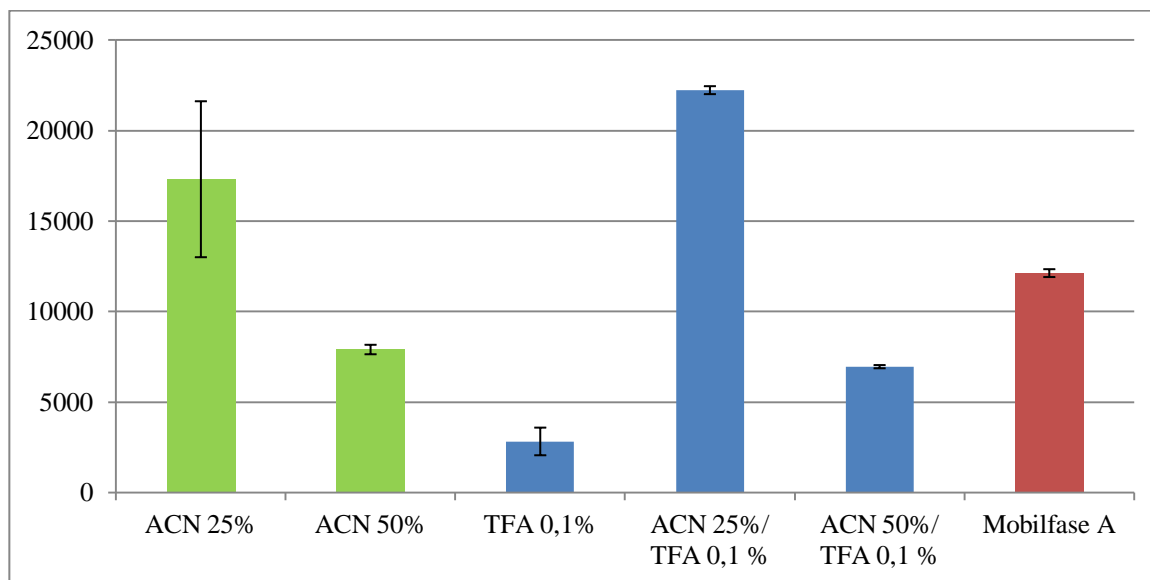
På bakgrunn av dette ble det konkludert med at polypropylenvialer og løsning i mobilfase A ga best stabilitet ved injeksjoner av hypokretin-1. Polypropylenvialene ble brukt i alle senere forsøk.

Valg av løsningsmiddel

Selv om det ikke ble reduksjon i signalintensitet ved bruk av polypropylenvialer, viste det seg at det var for store standardavvik for injeksjoner av hypokretin-1 i mobilfase A.

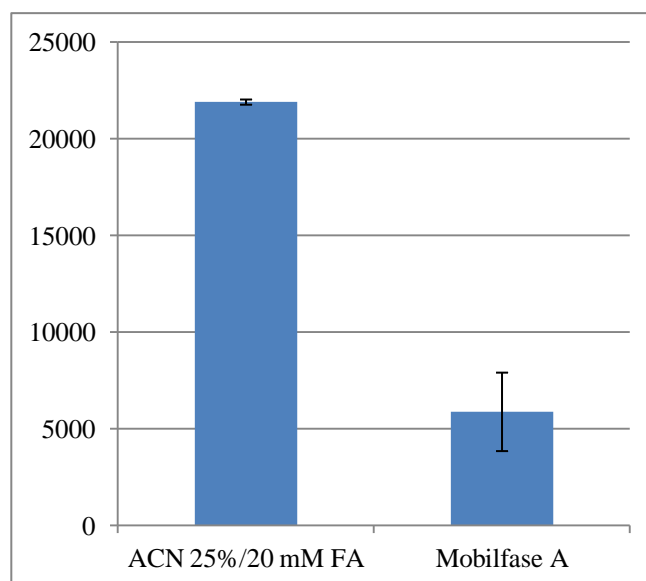
Etter ytterligere analyser var heller ikke de relative standardavvikene til hypokretin-1 i mobilfase A tilfredsstillende. Det ble mistenkt at peptidets løselighet i mobilfase A ikke var optimal og man ønsket derfor å se på sammensetningen av løsningen brukt til standarder. Triklorediksyre (TFA) ble benyttet i stedet for maursyre for surgjøring av løsningen. MeOH ble byttet med ACN for å se om dette kunne bedre løseligheten av hypokretin-1. Det ble også laget løsninger med ACN og ionebyttet vann for å se effekten av TFA. Figur 6-8 viser resultatene av forsøket. Ved å øke

løsemiddelstyrken noe, ser det ut til at man styrker peptidets signalintensitet, mens ved ytterligere økning sank løseligheten. Av de testede løsningene tyder det på at 25 % ACN i 0,1 % TFA er en god blanding.



Figur 6-8 Figuren viser resultater av forsøk med ulike løsemidler for standarder av 1 µg/mL hypokretin-1. Y-aksen viser signalintensiteten. De blå søylene viser topphøyden til løsemidler surgjort med TFA. De grønne søylene viser topphøyden itl ACN i ionebyttet vann. Den røde søylen viser topphøyden til mobilfase A som hittil har vært benyttet som løsemiddel. 25 % ACN i 0,1 % TFA skiller seg ut som det beste løsemiddelet. $n = 2$.

I et forsøk der man sammenlignet mobilfase A og 25 % ACN i 20 mM maursyre som løsemidler for hypokretin-1 viste det seg at ACN- og maursyreblandingen ga betydelig bedre resultater enn mobilfase A (figur 6-9). Fra figuren kan det se ut som maursyre er bedre egnet som løsemiddel enn TFA hvis man sammenligner forholdet i signatlintensitet i figur 6-8 og 6-9. Maursyre er dessuten foretrukket foran TFA på grunn av TFAs evne til å undertrykke ionisering i MS. Det ble derfor konkludert med at 25 % ACN i 20 mM maursyre er et godt egnet løsemiddel for hypokretin-1-standarder. Da det ble foretatt økning av løsemiddelstyrken til standardene, førte dette til endringer i gradienten til LC-MS-metoden (se kapittel 5.4.2).



Figur 6-9 Figuren viser topphøyden til 500 ng/mL hypocretin-1-standarder løst i henholdsvis 25 % ACN i 20 mM maursyre og mobilfase A ($n=3$).

6.3 Prøveopparbeidelse

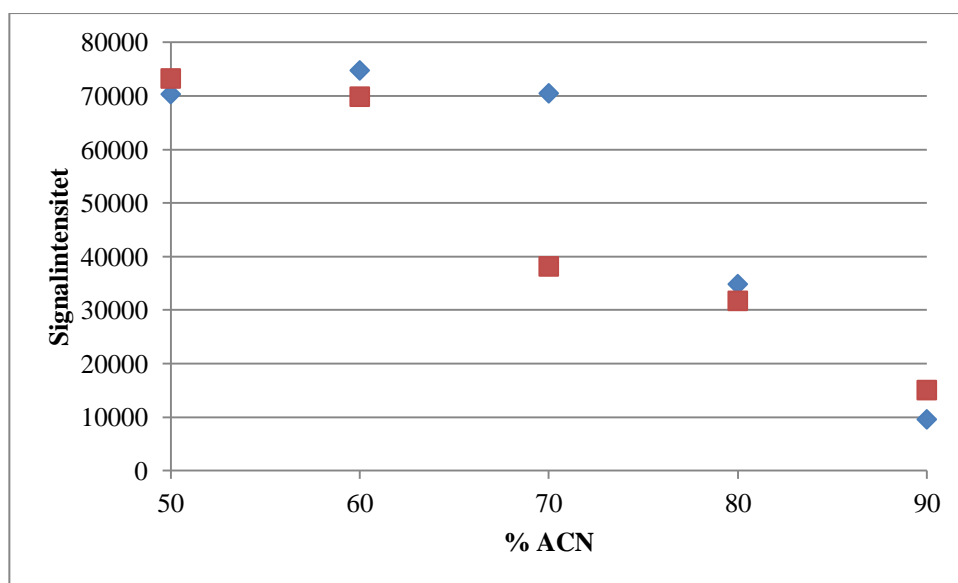
Det er svært viktig å finne en effektiv prøveopparbeidelsesmetode for hypocretin-1. Når man ønsker å detektere lave konsentrasjoner av et peptid er det ikke bare viktig med et godt utbytte, men også en metode som gir rom for oppkonsentrering av prøveløsningen. Rene kromatogrammer og metodens enkelhet spiller også inn.

Det er blitt testet ut mange ulike prøveopparbeidelsesmetoder. Noen metoder har blitt forsøkt før de raskt ble forkastet. Andre metoder har vist potensial og har blitt testet grundigere ut. I dette kapittelet vil vi først gjennomgå de ulike metodene som har vært brukt før man sammenligner resultatene til slutt.

6.3.1 Proteinfelling

Proteinfelling er en svært enkel og lite tidkrevende prøveopparbeidelsesmetode. Dette var den første metoden som ble testet ut. Proteinfelling er en metode som gir godt utbytte, men relativt forurensede prøver kan føre til støy og interferens i kromatogrammet. Proteinfelling har også tidligere blitt brukt til å ekstrahere peptider fra spinalvæske [32]. En metode med ACN som fellingsreagens ble benyttet. Først

ble det brukt 50 % ACN og 50 % prøveløsning som ga tilfredsstillende resultat for hypokretin-1 i høye konsentrasjoner i surrogatmatriks. Siden dette så ut til å fungere, ble det videre gjort et forsøk for å se om man kun øke utbytte ytterligere ved øke mengden fellingsreagens. Figur 6-10 viser at det liten forskjell på 50 og 60 % andel ACN. Signalintensiteten ser ut til å avta etter 70 % ACN. Det ble valgt å gå videre med 60 % fellingsreagens da det så ut til å gi marginalt bedre utbytte enn 50 %.



Figur 6-10 Figuren viser signalintensitet i forhold til mengde fellingsreagens (% ACN) for 200 ng/mL hypokretin-1 løst i surrogatmatriks. Punktene viser signalintensiteten på de to parallellene for ulike mengder ACN ($n = 2$).

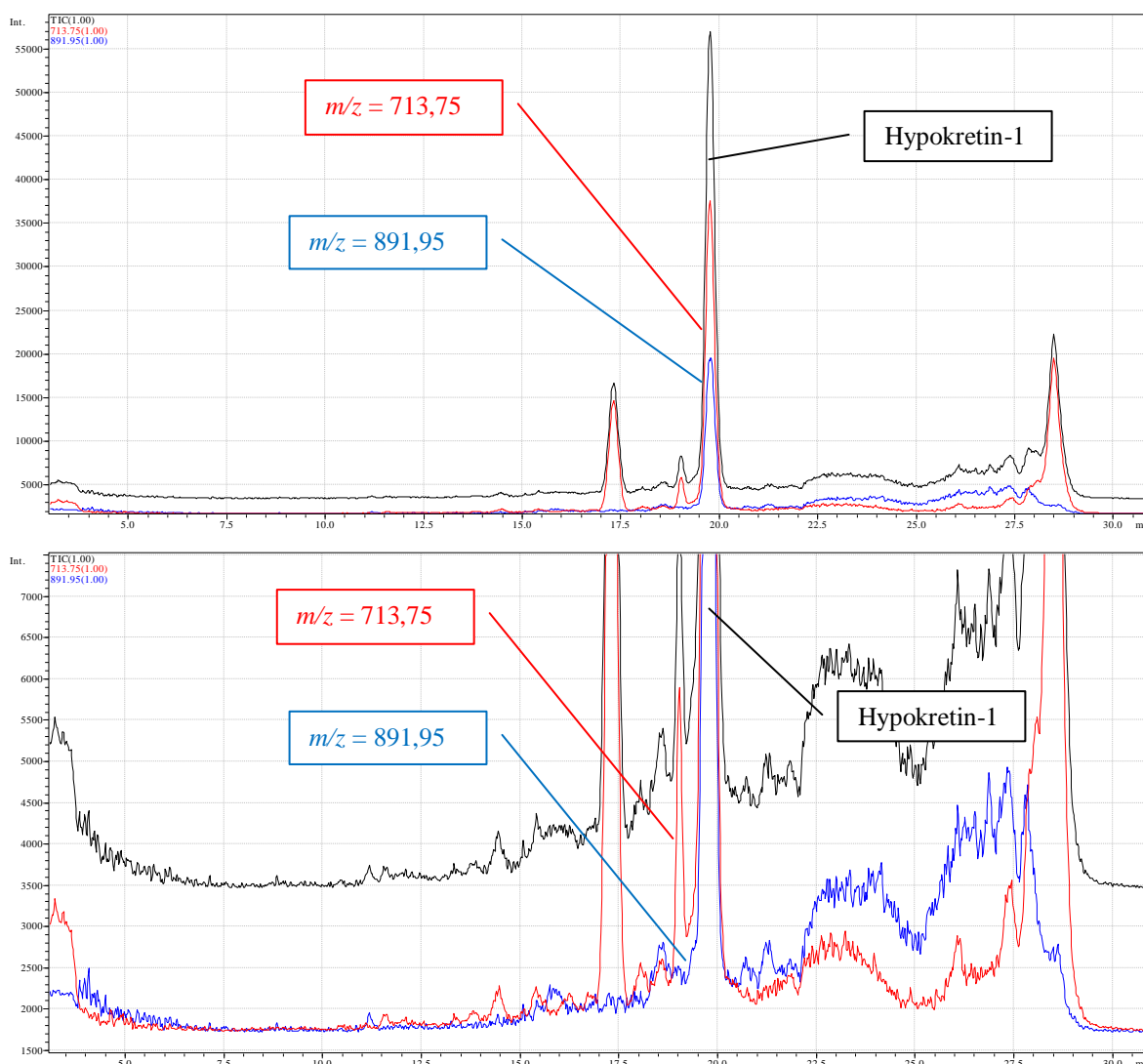
Det ble gjort en rekke forsøk med proteinfelling med 60 % ACN. Varierende mengder hypokretin-1 i surrogatmatriks ble opprensket og analysert med LC-MS. I tabell 6-3 under ser man et sett med resultater som kan anses representativt for arbeidet som ble utført.

Tabell 6-3 Tabellen viser resultater for proteinfelling som prøveopparbeidelsesmetode. Hypokretin-1 ble fortynnet i surrogatmatriks til konsentrasjonene 10, 50, 100 og 200 ng/mL. Proteinfelling ble brukt som eneste prøveopparbeidelsesmetode. Det ble brukt forkolonne under analysen.

Konsentrasjon (ng/mL)	10*	50*	100	200*
Volum (µL)	100	100	100	100
n	2	2	5	2
Topp høyde	683	8906	38758	68757
Utbytte	13,7 %	35,7 %	56,5 %	68,8 %
RSD (Utbytte)	NA	NA	24,2 %	NA
LOD	3,67 ng/mL	1,71 ng/mL	1,65 ng/mL	0,63 ng/mL
LOQ	11,03 ng/mL	5,14 ng/mL	4,95 ng/mL	1,90 ng/mL

*) Det oppsto problemer med standardene i kjøringene på hhv. 10, 50 og 200 ng/mL. En standard fra en tidligere kjøring ble benyttet. Dette gjør at utbyttet for disse ikke er gyldige og kan kun brukes som en indikasjon.

Proteinfelling ble testet ut på høye og lave konsentrasjoner av hypokretin-1. Man ønsket å se om også lave konsentrasjoner lot seg detektere med ved bruk av denne prøveopparbeidelsesmetoden. Selv om prøvolumet er forholdsvis lite, gir det en god indikasjon på hvordan prøveopparbeidelsesmetoden fungerer.



Figur 6-11 Figuren viser kromatogram av 100 ng/mL hypokretin-1 i surrogatmatriks som har gjennomgått prøveopparbeidelse med proteinfelling med 60 % ACN. Øverst ser man hypokretin-1 ved $t_R = 19,8$ minutter. Under ser man grunnlinjen i intervallet 1500-7500.

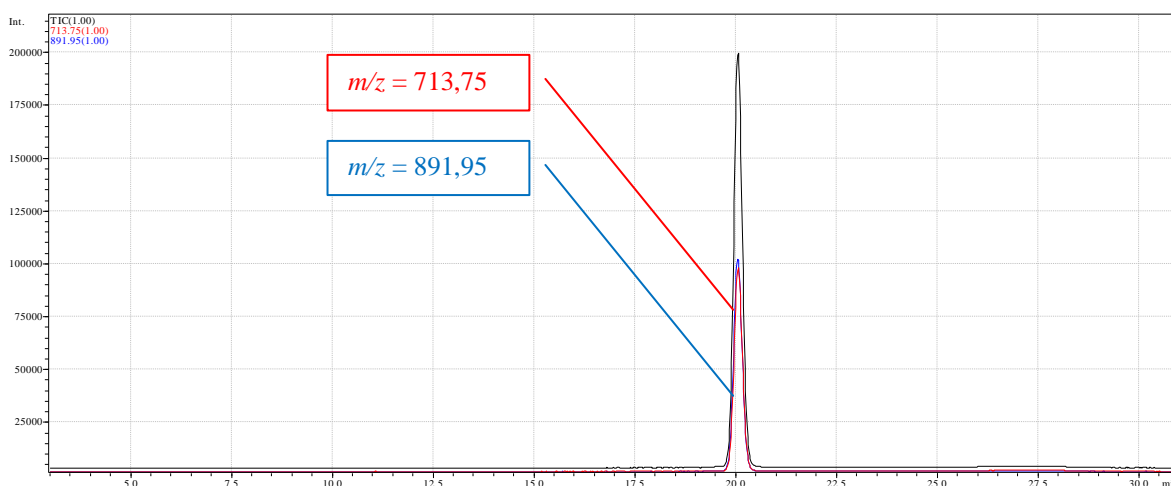
Som man ser av resultatet for 100 ng/mL hypokretin-1 er variasjonen stor med RSD > 20 (se tabell 6-3). Topphøyden er lovende, men støyhøyden gjør at man vanskelig kan detektere lavere konsentrasjoner (se figur 6-11). Denne uryddige grunnlinjen gjør seg gjeldende i beregningen av deteksjons- og kvantifiseringsgrensen som er forholdsvis høye, topphøydene tatt i betraktning. Analysene gjort med lavere konsentrasjoner av hypokretin-1 bekrefter dette.

6.3.2 Ultrafiltrering

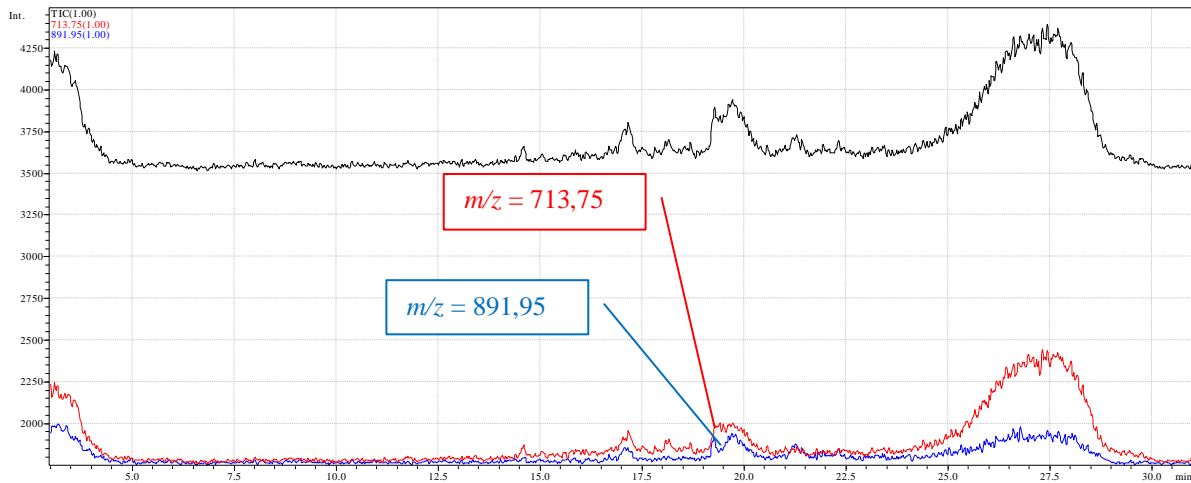
Ultrafiltrering ble forsøkt for å se om man ved et enkelt trinn kunne fjerne større proteiner ved en porestørrelse som i teorien ikke skulle påvirke analytten.

Hypokretin-1 er relativt sett et lite molekyl sammenlignet med plasmaproteiner. Med molekylvekt på 3.500 Da var hypotesen at man ved filtrering kunne fjerne de større proteinene i surrogatmatriksen. Ved å bruke filter med *cut off* på 5.000 Da ville man ved et enkelt trinn få god opprensing av prøven. Vandige prøver ble brukt for å se om analytten passerte filteret. Ved analyse av filtratet ved 5.000 Da ultrafiltrering, fikk man ingen synlige topper ved m/z -verdiene 713,75 og 891,95 (se figur 6-13).

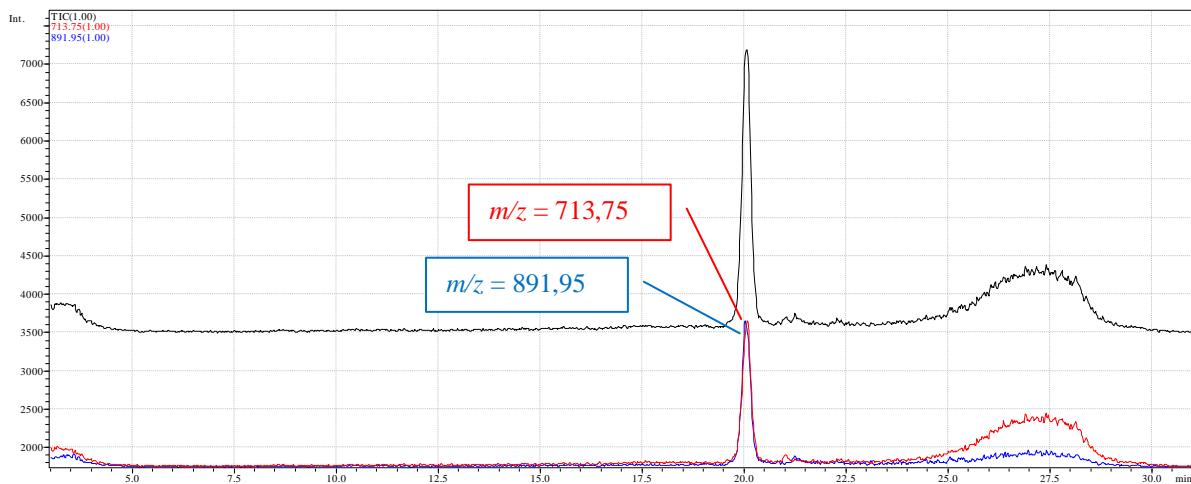
Volumet på ca 25 µL som ble liggende igjen over filteret ble også analysert (se figur 6-14). Her viste analysene tilstedeværelse av hypokretin-1, men på langt nær samme konsentrasjon (< 1 %) som standarden. Dette kan tyde på hypokretin-1 sitter fast inne i filteret. Samme forsøk ble foretatt med filter med *cut off* på 10.000 Da uten endring i resultatet. Hypokretin-1 så ut til å interagere med filtermaterialet og ultrafiltrering ble forkastet som prøveopparbeidelsesmetode.



Figur 6-12 Figuren viser standarden med 1 µg/mL hypokretin-1 i mobilfase A. t_R = 20,1 minutter. Topp høyde: ca. 196.000.



Figur 6-13 Figuren viser kromatogrammet etter utført ultrafiltrasjon av 1 µg/mL hypocretin-1 i mobilfase A. Ingen synlige topper ved $t_R = 20,1$ minutter.



Figur 6-14 Figuren viser kromatogrammet til analysen av ufiltrert væske av 1 µg/mL hypocretin-1 i mobilfase A som ble liggende igjen på toppen av filteret (dødvolum). Ca. 25 µL prøveløsningen ble tilsatt 30 µL mobilfase A og injisert i LC-MS. En tydelig topp ved $t_R = 20,1$ minutter. Topphøyden på ca. 3600 er likevel mindre enn 1 % av standarden.

6.3.3 Elektromembranekstraksjon

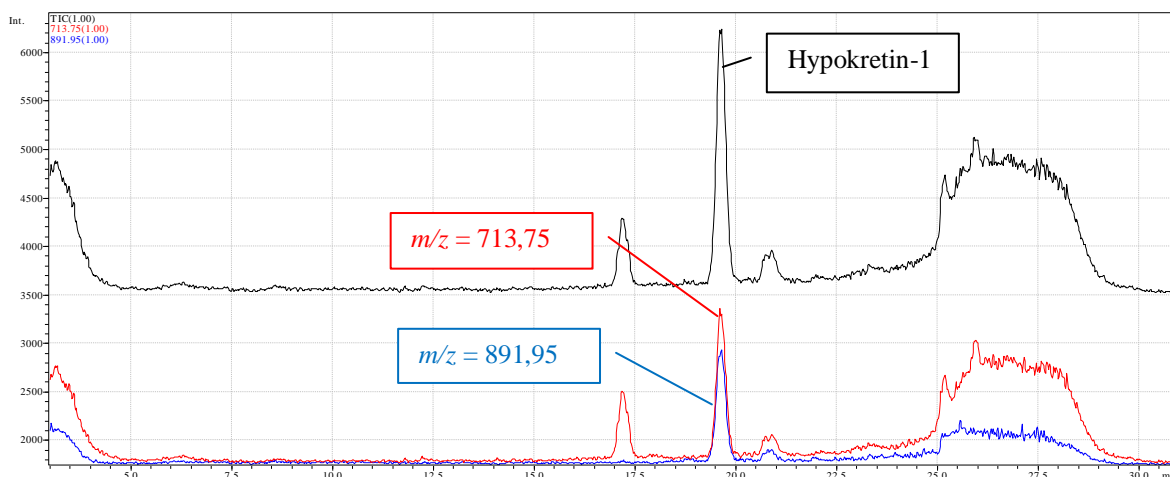
EME ble testet ut på grunn av enkel og kort prøveopparbeidelsesprosess. Den har også vist seg effektiv ved ekstraksjon av peptider [29]. Den gir dessuten med

oppsettet som skissert i kapittel 4.3.4, muligheter for oppkonsentrering med en teoretisk oppkonsentreringsfaktor på 25. Det ble valgt ut to forskjellige organiske faser, eugenol og 1-oktanol. Vandige prøveløsninger ble sammenlignet med prøveløsning i surrogatmatriks (se tabell 6-4). Det viste seg at eugenol fungerte dårlig som organisk fase da kromatogrammene skilte seg lite fra blank. Prøvene kjørt med 1-oktanol som organisk fase ga derimot resultater. Riktignok best for de vandige løsningene, men også for 50 ng/mL hypokretin-1 i surrogatmatriks (se figur 6-15).

Tabell 6-4 Tabellen viser resultater fra EME som prøveopparbeidelsesmetode. 1-oktanol ble benyttet som organisk fase. Prøvene ble ekstrahert gjennom en kunstig væskemembran ved hjelp av elektrisk spenning over til 20 mM maursyre. Prøven ble deretter injisert direkte i LC-MS.

	100 mM maursyre	Surrogatmatriks
Kons. (ng/mL)	50	50
Volum (µL)	500	500
n	2	2
Topp høyde	20.343	1.968
Utbytte	14,7 %	1,42 %
LOD (ng/mL)	0,7	4,2
LOQ (ng/mL)	2,0	12,6

Kromatogrammene var rene og med lav støyhøyde sammenlignet med blant annet proteinfelling (se figur 6-10). Selv om hypokretin-1 lot seg identifisere, var utbytte på lave 1,4 % og estimert LOQ høy i forhold til andre prøveopparbeidelsesmetoder. Det lave utbytte av hypokretin-1 i surrogatmatriks gjorde at man ikke ønsket å gå videre med denne metoden.



Figur 6-15 Figuren viser et eksempel på kromatogram med EME som prøveopparbeidelse. Utgangskonsentrasjon var 50 ng/mL hypokretin-1 løst i surrogatmatriks. 1-oktanol ble brukt som organisk fase. $t_R = 19,8$ minutter.

6.3.4 Proteinfelling-SPE

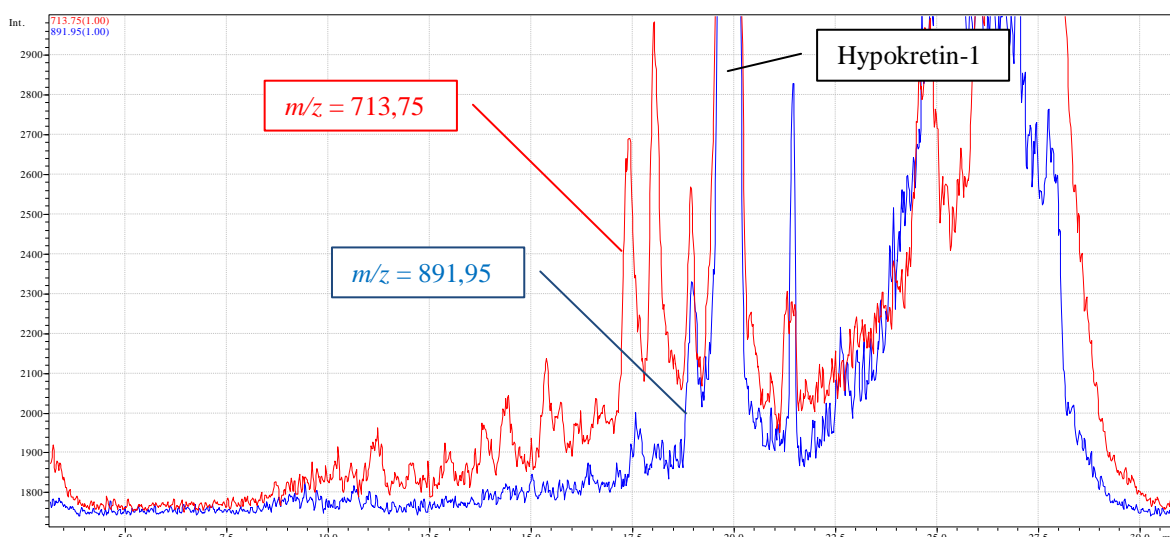
I et forsøk på å oppnå god opprensning av prøvene ble det utført en kombinasjon av proteinfelling og SPE. Hypotesen var at renere prøver skulle gi mindre støy på grunnlinjen og en reduksjon av LOD og LOQ.

Proteinfellingen ble utført som forklart i kapittel 5.3.1. SPE-metoden var den samme som ble brukt etter tryptisk klipp. Det ble gjort et innledende forsøk ($n = 2$) med relativt gode resultater (se tabell 6-5). Variasjonen mellom de to prøvene var likevel stor og eksperimentet ble gjentatt med 5 paralleller. Dette ga mindre variasjon med en RSD av utbytte på 17,4 % (se tabell 6-5).

Tabell 6-5 Resultat fra analyse proteinfelling-SPE

Konsentrasjon (ng/mL)	200	100
Volum (µL)	100	100
n	2	5
Topp høyde	73150	23990
Utbytte	52,6 %	35,7 %
RSD (Utbytte)	NA	17,4 %
LOD	1,0 ng/mL	0,79 ng/mL
LOQ	3,0 ng/mL	2,4 ng/mL

Til tross for lavt utbytte (36 – 53 %), oppnår man relativ god sensitivitet ved høye konsentrasjoner. Deteksjonsgrense under 1 ng/mL er et godt utgangspunkt for videre arbeid. Ser man nærmere på kromatogrammenes grunnlinje, finner man riktignok noen forurensninger i området; $t_R = 18 - 22$ minutter (se figur 6-16). Hypokretin-1 hadde en retensjonstid på ca. 19,8 minutter. Slike forurensninger kan potensielt øke usikkerheten ved analyse av lavere konsentrasjoner av analytten.



Figur 6-16 Figuren viser et eksempel på grunnlinjen til 200 ng/mL hypokretin-1 i surrogatmatriks ved proteinfelling-SPE. Flere topper i området $t_R = 18 - 22$ minutter.

6.3.5 SPE

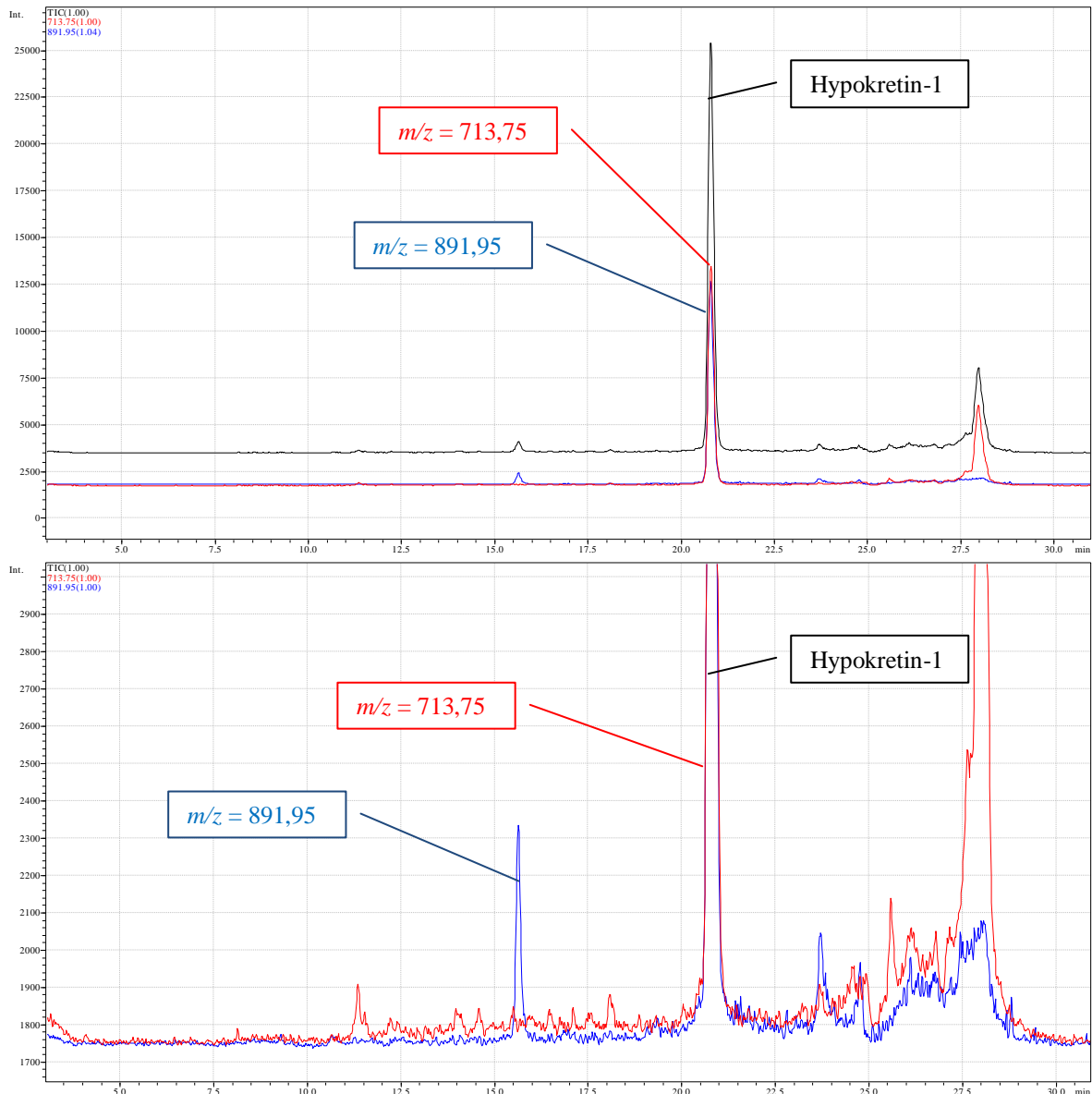
Selv om proteinfelling-SPE så ut til å fungere godt, ønsket man se om proteinfellingstrinnet var nødvendig. Det ble derfor utført prøveopparbeidelse med kun SPE for å se om dette ga tilstrekkelig opprensning. I disse forsøkene ble det brukt C18-sorbent og mobilfase B som elueringsløsning.

Det ble utført en rekke forsøk med SPE. Stor varians i signalintensitet og problemer med standardene løst i mobilfase A gjorde arbeidet vanskelig (se kapittel 6.1.4). Det ble likevel gjort analyser med SPE som ga relativt gode resultater med lite prøvevolum og høy analyttkonsentrasjon (se tabell 6-6).

Tabell 6-6 Resultater for SPE

Konsentrasjon (ng/mL)	200	100
Prøvevolum (µL)	100	100
n	2	5
Topp høyde	75.640	17.752
Utbytte	41,7 %	21,4 %
RSD (Utbytte)	NA	23,4 %
LOD	0,84 ng/mL	0,82 ng/mL
LOQ	2,5 ng/mL	2,5 ng/mL

Selv om utbytte for denne metoden var forholdsvis svakt (21,4 – 41,7 %) og relativt standardavvik på utbytte var høyt ($RSD > 20\%$), viste kromatogrammene fine grunnlinjer med lite støy og forurensninger (se figur 6-17). Noe overraskende hadde SPE renere kromatogrammer enn PP-SPE. Selv om utbytte var noe lavere, var deteksjonsgrensen tilsvarende for de to prøveopparbeidelsesmetodene. Også sammenlignet med EME og proteinfelling ga SPE god opprensning. SPE ga alt i alt lovende resultater og var foreløpig metoden det ble valgt å gå videre med.



Figur 6-17 Figuren viser kromatogram 100 ng/mL hypokretin-1 i surrogatmatiriks etter prøveopparbeidelse med SPE (over) og grunnlinjen under.

6.4 Sammenligning av metoder

Det er flere parametre som er viktig for valg av metode. På grunn av krav til deteksjon av svært lave analyttkonsentrasjoner, er det viktig å finne en metode som gir godt utbytte. Relativt standardavvik og kvantifiseringsgrense bør være lavest mulig samtidig som kromatogrammene bør være rene og lett å tolke. Ingen av

metodene som hittil har vært testet ut oppfyller alle disse kriteriene. Noen regnes likevel som bedre enn andre. Noen metoder viste tidlig åpenbare svakheter og ble raskt forkastet. Andre metoder som viste potensial ble grundigere testet ut. I dette kapittelet sammenlignes prøveopparbeidelsesmetodene som hittil har vært utprøvd.

Ultrafiltrering var en av metodene som raskt ble forkastet. Metoden ga utbytte på tilnærmet null og man så ingen grunn til å fortsette eksperimenter med denne. En annen metode som tidlig ble ekskludert var EME. Selv om den ga svært god opprensning og dermed rene kromatogrammer (se figur 6-15), var utbytte for lavt med prøver der hypokretin-1 var løst i surrogatmatriks (se tabell 6-7). Metoden ble testet ut med to forskjellige organiske faser og videre optimalisering av metoden kunne gitt bedre resultater. Utgangspunktet med lavt utbytte og relativt høy LOQ, var likevel for dårlig til at man valgte å bruke mer tid på denne metoden.

Tabell 6-7 oppsummerer de ulike prøvopparbeidelsesmetodene som har gitt resultater. Prøvevolum og analyttkonsentrasjon er valgt for enkelt å kunne sammenligne metodene.

Likt for alle metodene er at utbyttet er lavt. Proteinfelling gir størst utbytte av metodene med sine 56,5 %. Proteinfelling er også metoden som gir de minst rene kromatogrammene (se figur 6-18). My støy på grunnlinjen gir høy LOQ sammenlignet med PP-SPE og SPE. Det relative standardavviket på utbytte er dessuten høyest av metodene som er testet.

PP-SPE ga utbytte på 35,7 % som må regnes for lavt. Rene kromatogrammer fører til langt lavere LOQ sammenlignet med for eksempel proteinfelling (se figur 6-18). PP-SPE har dessuten lavere RSD enn de andre metodene.

SPE gir et relativt lavt utbytte, men har de reneste kromatogrammene og dermed tilsvarende LOQ som PP-SPE (se figur 6-18). RSD for utbytte er riktignok noe høyere enn for PP-SPE.

Flere av metodene gir god opprensning og rene kromatogrammer. LOQ er fortsatt høy sammenlignet med den ønskede kvantifiseringsgrensen på 110 pg/mL, men likevel lovende med tanke på videreutvikling av metoder og eventuell overføring av metoder til mer sensitive instrumenter. Utbyttene er derimot generelt sett lave. RSD er også i høyeste laget for metodene som er testet ut. Det kan være flere faktorer som bidrar til dette. Peptidets løselighet og muligens dets adsorberende egenskaper som vist i kapittel 6.2.3, kan forklare noe av svingningene i resultatene, både når det gjelder utbytte og relativt standardavvik. Selv om det er tatt forhåndsregler ved analyse ut i fra undersøkelser gjort i kapittel 6.2.3, kan det ikke utelukkes at peptidets egenskaper kan ha ført til problemer med utbytte og RSD.

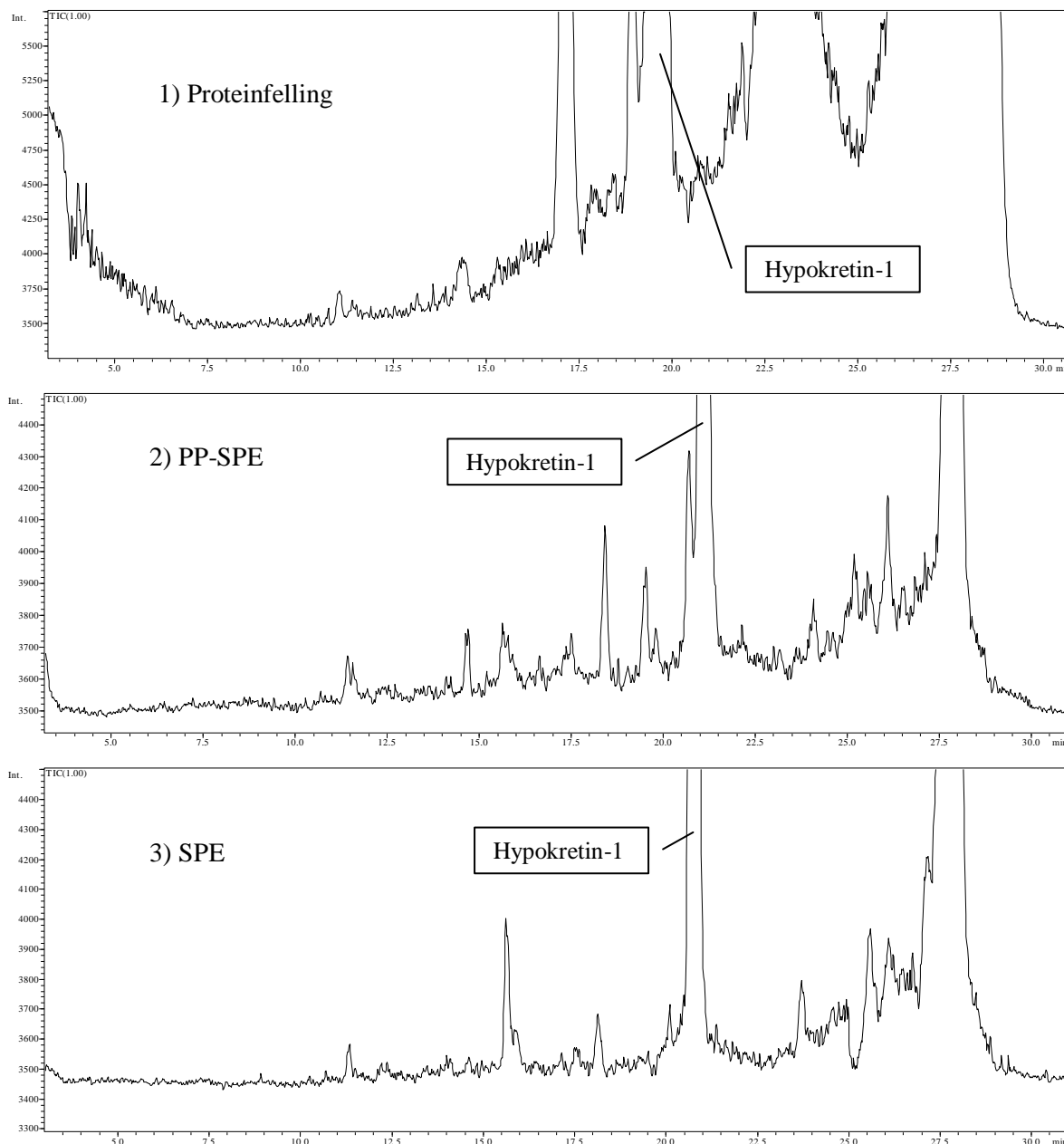
Tabell 6-7 Tabellen sammenligner de forskjellige prøveopparbeidelsesmetodene. Proteinfelling-SPE og SPE skiller seg ut lavere LOD og LOQ sammenlignet med de andre metodene. Utbyttene er likevel relativt sett lave.

	Proteinfelling	EME	PP-SPE*	SPE
Kons. (ng/mL)	100	50	100	100
Volum	100	500	100	100
n	5	2	5	5
Utbytte (%)	56,5	1,4	35,7	21,4
RSD (utbytte)	24,2 %	NA	17,4 %	23,4 %
LOD (ng/mL)	1,7	4,2	0,79	0,82
LOQ (ng/mL)	5,0	12,6	2,4	2,5

* PP-SPE er forkortelse av Protein Percipitation (proteinfelling) - SPE

I figur 6-18 sammenlignes grunnlinjene til henholdsvis proteinfelling, PP-SPE og SPE. Proteinfelling gir tydelig mest grunnlinjestøy, mens PP-SPE og SPE gir renere kromatogrammer. Figuren viser hvordan grunnlinjen til PP-SPE har noen flere forurensninger i området hvor hypokretin-1 elueres, samt noe mer støy på grunnlinjen enn SPE. Det er tydelig at SPE alene gir tilstrekkelig opprensning for hypokretin-1 i surrogatmatriks. Kromatogrammets renhet oppveier SPE-metodens lavere utbytte. LOQ er tilsvarende for de to metodene. Selv om SPE ikke oppfyller kriteriene nevnt

innledningsvis, ønsket man å videreutvikle metoden. Å fjerne proteinfelling i forkant er tidsbesparende og gjør at man reduserer bruk av løsemidler.



Figur 6-18 Figuren sammenligner grunnlinjen (TIC) til 1) proteinfelling 2) PP-SPE og 3) SPE.

6.5 Optimalisering av SPE-metode

Det ble tatt utgangspunkt i SPE-metoden som ble brukt ved tryptisk klipp (se kaptittel 5.3.1). Det ble gjort en gjennomgang av vaske- og elueringsløsning og sorbent.

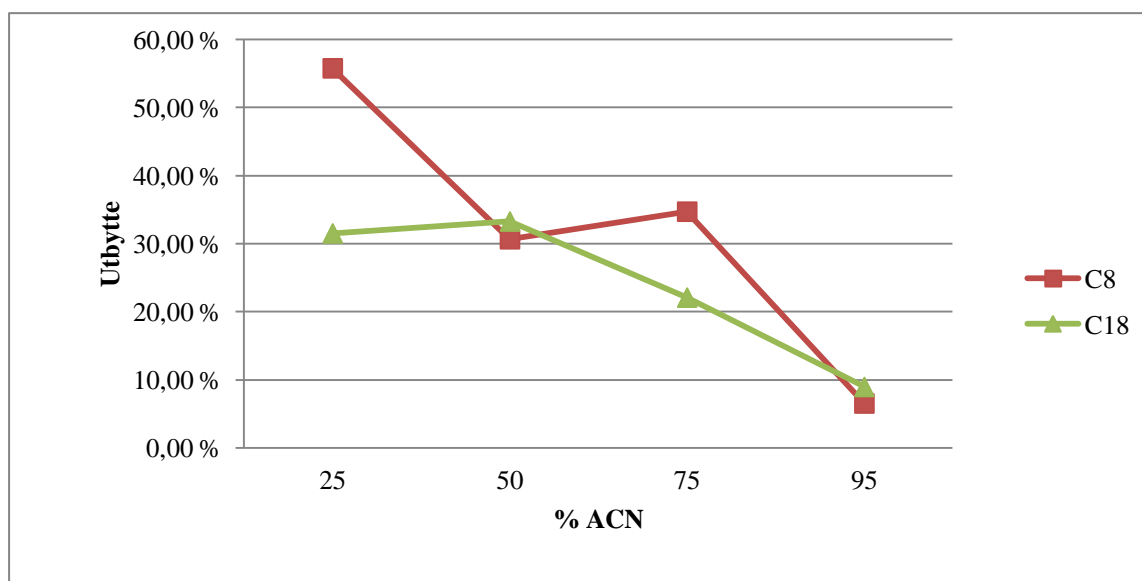
6.5.1 Valg av vaskeløsning

I den initiale SPE-prosedyren ble 50 μ L 20 mM maursyre brukt som vaskeløsning. For å se om vaskeløsningen eluerte ut hypokretin-1, ble en test for gjennombrudd utført. Kolonnen ble først kondisjonert og prøveløsningen ble tilsatt. Vaskeløsningen ble deretter presset gjennom sorbenten og samlet i et LoBind eppendorfrør. Det ble analysert tre paralleller med LC-MS. Ingen av prøvene viste spor av hypokretin-1 i kromatogrammene. Siden kromatogrammene fra tidligere forsøk var forholdsvis rene, var det ikke behov for å teste vaskeløsninger tilsatt organisk modifikator for eventuelt å kunne eluere ut hydrofobe forurensinger. Det ble derfor bestemt å fortsette med vaskeløsningen på 20 mM maursyre i senere eksperimenter.

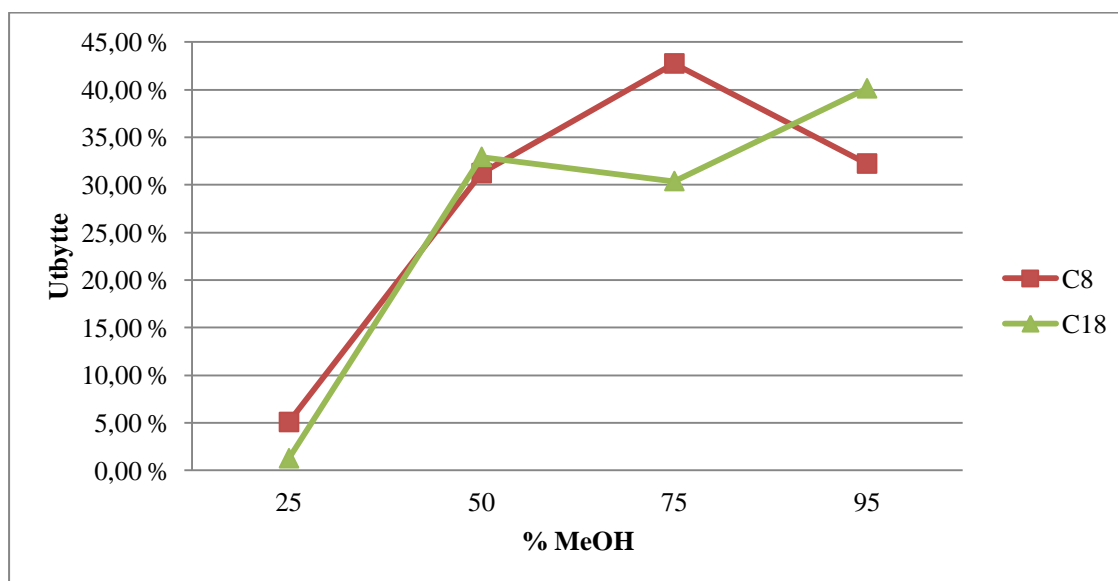
6.5.2 Valg av elueringsløsning og sorbent

For å se om utbytte kunne forbedres, ble det sett på sorbent og elueringsløsning. I de innledende forsøkene ble det brukt C18-pakkemateriale i SPE-kolonnen. Mobilfase B ble brukt i elueringstrinnet, en sur løsning bestående 5 % 20 mM maursyre og 95 % MeOH.

Det ble nå gjort nye forsøk med elueringsløsninger. Et med MeOH som organisk modifikator, det andre med ACN. Ulike løsemiddelstyrker ble testet med både C8 og C18 pakkemateriale i SPE-kolonnen (se figur 6-19 og 6-20).



Figur 6-19 Valg av sorbent og elueringsløsning. Figuren viser utbytte i % i forhold til mengde ACN i elueringsløsningen. 500 ng/mL hypokretin-1 gjennomgikk prøveopparbeidelse med hhv. C8 og C18 SPE-kolonner (n=2).



Figur 6-20 Valg av elueringsløsning og sorbent. Figuren viser utbytte i % i forhold til mengde MeOH i elueringsløsningen. 500 ng/mL hypokretin-1 gjennomgikk prøveopparbeidelse med hhv. C8 og C18 SPE-kolonner (n=2).

Valg av sorbent

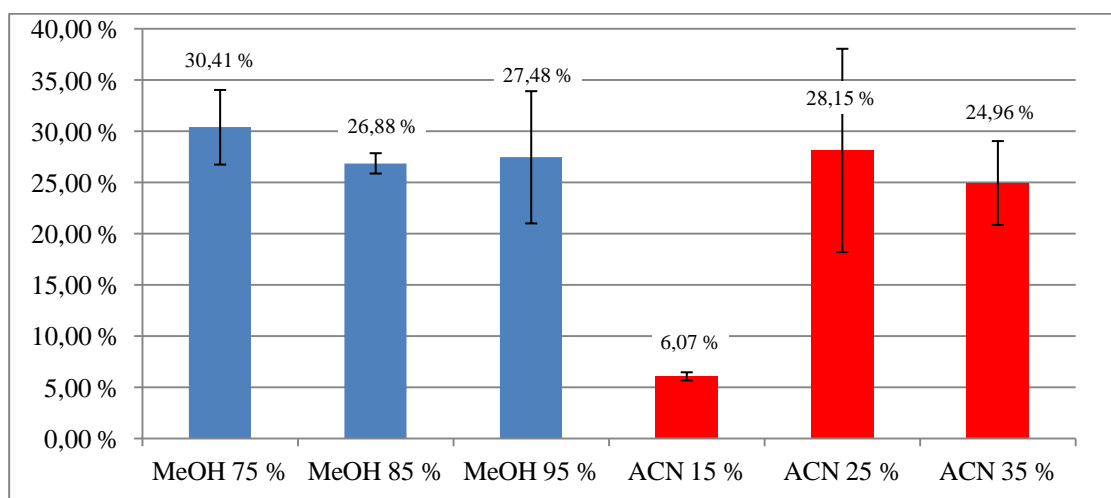
Figurene (6-19 og 6-20) viser at det var liten forskjell på sorbentene. C8-materialet ga likevel noe bedre utbytte i forsøkene der ACN ble brukt i elueringsløsningen. Spesielt

ved 25 % ACN ser man en betydelig forskjell i utbytte. En mulig forklaring kan være at løsemiddelstyrken ikke var tilstrekkelig til å bryte alle de hydrofobe interaksjonene mellom analytten og C18-kolonnen sammenlignet med C8.

Valg av elueringsløsning

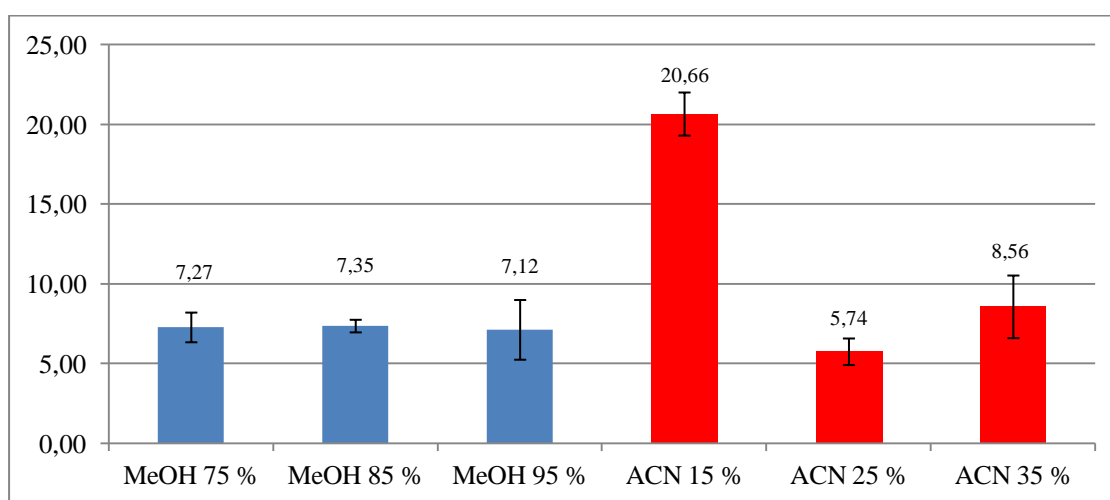
Figur 6-20 viser utbytte i forhold til andel MeOH i elueringsløsningen. Tendensen er at jo høyere andel organisk løsemiddel, jo høyere utbytte. Denne tendensen ser man derimot ikke i figur 6-19. Utbyttet ser ut til å reduseres ved økt andel ACN. Hva dette skyldes er vanskelig å si, men det kan være et problem med løselighet av peptidet i løsninger med høy andel ACN. Det har tidligere blitt vist at økning av ACN-andelen i elueringsløsningen kan gi dårligere løselighet og lavere utbytte [33].

Figurene viser at utbytte fortsatt er forholdsvis lavt (alle < 60 %), men likevel en bedring i forhold til mobilfase A. Spesielt løsningene med 25 % ACN og 75 % MeOH skiller seg positivt ut med utbytter på hhv 55,8 og 42,7 %. Områdene rundt disse konsentrasjonene ble nærmere undersøkt (figur 6-21 og 6-22).



Figur 6-21 Figuren viser gjennomsnitts utbytte av 500 ng/mL hypocretin-1 i surrogatmatriks med SPE. Det ble testet ut elueringsløsninger med varierende mengde organisk modifikator. MeOH og ACN ble tilsatt en 20 mM maursyreløsning. $n = 3$.

Det viste seg at det ikke var store forskjeller på elueringsløsningene med unntak av 15 % ACN som ga betydelig dårligere utbytte. Elueringsløsningen med 75 % MeOH ga marginalt bedre utbytte enn 25 % ACN, men grunnlinjen hadde noe mer støy som førte til at deteksjonsgrensen for 25 % ACN var noe lavere enn for 75 % MeOH (figur 6-22). Det er vanskelig å konkludere med at den ene er bedre enn den andre, men det ble gjort et valg på å fortsette 25 % ACN i 20 mM maursyre ettersom dette også er et velegnet løsemiddel for hypokretin-1 (se kapittel 6.2.3). Dessuten er løsemiddelstyrken tilstrekkelig svak så man slipper inndamping og reløsing etter SPE-prosedyren. Eluatet kan altså injiseres direkte i LC-MS.



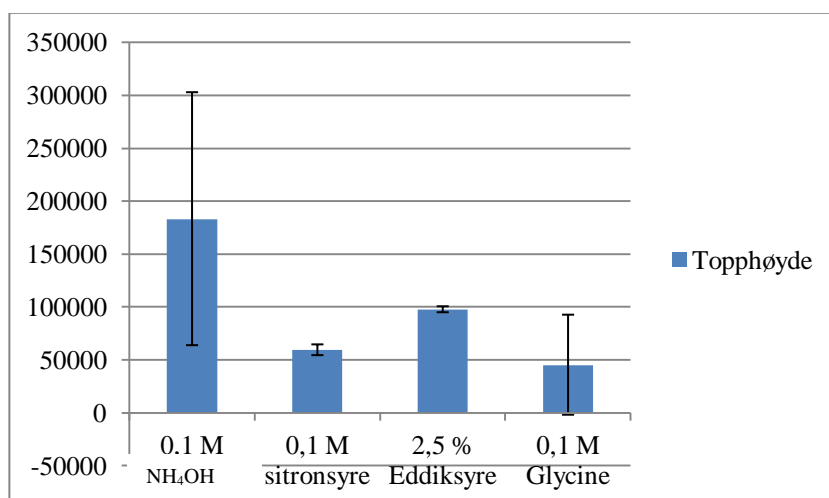
Figur 6-22 Figuren viser deteksjonsgrensen i ng/mL oppnådd med de forskjellige elueringsløsningene (n=3).

6.6 Forsøk med immunoaffinitet

Da vi hadde tilgang på antistoff til hypokretin-1, ønsket vi å gjennomføre forsøk med immunoaffinitet som prøveopparbeidelsesmetode. Immunoaffinitet kan være svært effektivt. Ved god spesifisitet overfor analytten vil antistoffbasert opprensning gi svært rene kromatogrammer. Tiden var knapp, men det ble foretatt to forsøk med antistoff for å se på metodens potensial sammenlignet med optimalisert SPE.

Elueringsbuffer

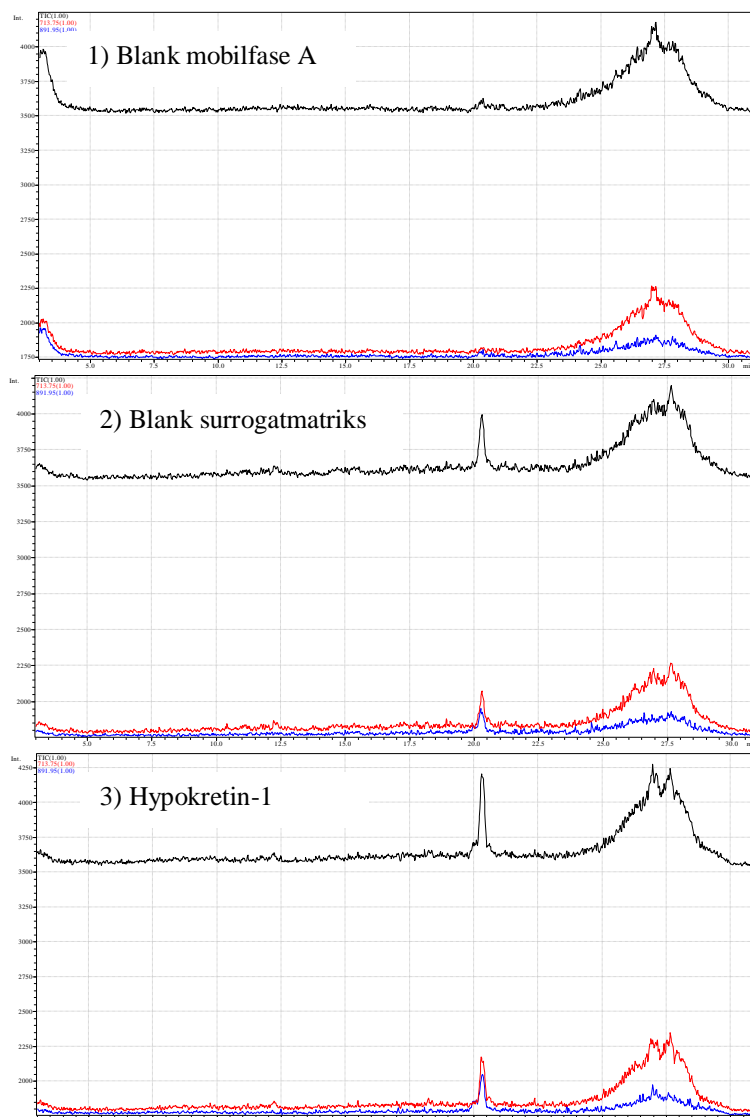
Før man gikk i gang med forsøkene måtte man finne en egnet elueringsbuffer til å bryte interaksjonene mellom antigen og antistoff. Bufferne ble testet ut med hensyn til løselighet for analytten. Valget av elueringsbuffer stod mellom 2,5 % eddiksyre, 0,1 M Glysin, 0,1 M sitronsyre og 0,1 M NH_4OH . Hypokretin-1 ble løst i de ulike elueringsbufferne og analysert med LC-MS. Resultatene viser at NH_4OH ga høyest gjennomsnittlig topphøyde (se figur 6-23). Det ble likevel valgt å gå videre med eddiksyre som elueringsbuffer siden de to parallellene til NH_4OH viste stor variasjon.



Figur 6-23 Figuren viser resultater fra 200 ng/mL hypokretin-1 løst i forskjellige elueringsbuffer og analysert med LC-MS. Stolpene viser topphøyden. $n = 2$.

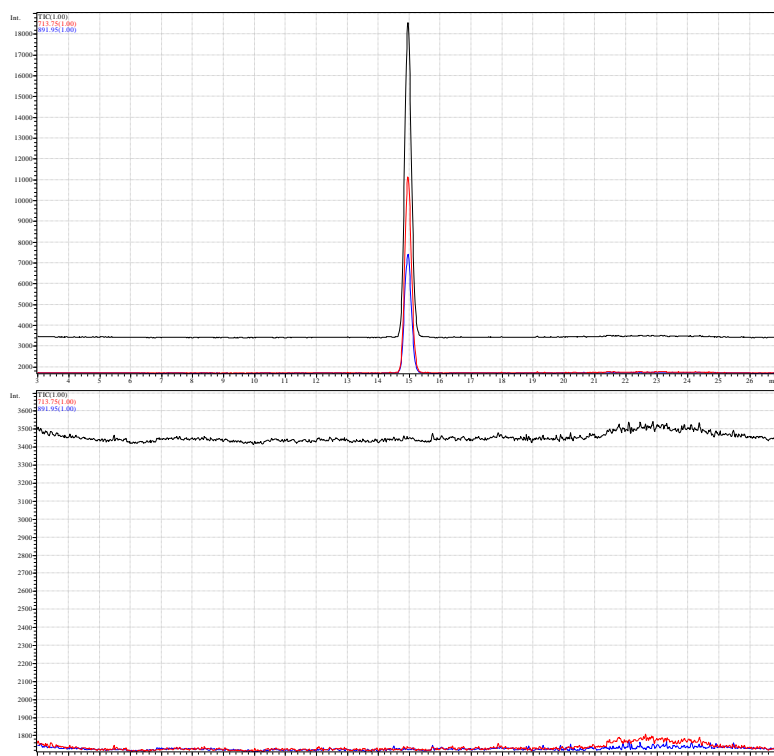
Immunocapture

Det ble gjennomført to forsøk med hypokretin-1 løst i surrogatmatriks, med henholdsvis 5 og 3 paralleller. I første forsøk ble det observert en liten topp ved $t_R = 20,3$ minutter (se figur 6-24). Siden blankprøven også hadde tilsvarende topp, ble det nødvendig med en ny gjennomføring av eksperimentet.



Figur 6-24 Figuren viser 3 kromatogram fra første analyse med immunoaffinitet som prøveoppbeidelse. Figur 1) viser blank mobilfase A. 2) viser blank surrogatmatriksprøve gjennomgått immunoaffinitet. 3) viser 1 µg/mL hypokretin-1 gjennomgått immunoaffinitet.

Forsøket ble gjentatt med 3 paralleller. Denne gangen lot ikke analytten seg identifisere verken på blank eller i selve prøven. Det ble kjørt standarder i samme kjøring som ga gode resultater og utelukket eventuelle feil med oppsett av apparatur (se figur 6-25).



Figur 6-25 Figuren viser standard 1 µg/mL hypocretin-1 i 25 % ACN i 20 mM maursyre (over) og en prøveløsning gjennomgått immunocapture (under). Ren bunnlinje, men ingen synlige topper ved denne prøveopparbeidelsesmetoden.

Dette er en metode med mange trinn og to forsøk er ikke nok for å konkludere for eller mot bruk av denne. Dessverre ble det verken tid til flere forsøk eller gjennomgang av de forskjellige trinnene i prosedyren for eventuell feilsøking. Man bør dessuten nevne at metoden ikke var optimal da det ble brukt LoBind eppendorfrør og sentrifuge til å skille supernatanten og antistoffkoblede kuler. Det er muligheter for at kuler vil forsvinne underveis i prosedyren og utbytte reduseres. Dette forklarer likevel ikke det totale fraværet av hypocretin-1 ved LC-MS-analysen. Personlige feil under prosedyren kan heller ikke utelukkes og flere forsøk trengs for å konkludere hvorvidt denne metoden kan benyttes for hypocretin-1.

6.7 Videre arbeid

Etter å ha funnet en egnet prøveopparbeidelsesmetode, gjenstår fortsatt en del arbeid før en diagnostisk LC-MS-metode kan implementeres. Det videre arbeidet er punktvis oppsummert under:

- Etter å ha optimalisert prøveopparbeidelsesmetoden med SPE, bør det gjøres analyser med denne. Det ble ikke tid til analyser med optimalisert SPE-metode. Dette bør gjøres før metoden overføres til instrumenter med bedre sensitivitet.
- Singelkvadрупolen som er blitt brukt som analyseverktøy i denne oppgaven gir ikke tilstrekkelig god sensitivitet for bestemmelse av de lave konsentrasjonene av hypokretin-1. Selv med gode resultater, har man ikke klart å oppnå deteksjonsgrense på mer enn 1 ng/mL. Dette er fortsatt minst 10 ganger for høyt i forhold til den diagnostiske grensen på 110 pg/mL [7]. Likevel er det ikke umulig presse deteksjonsgrensen nedover med instrumenter med høyere sensitivitet. LC-MS-metoden fra singelkvadрупolen bør i første omgang overføres til en trippelkvadрупol som sannsynligvis vil gi lavere deteksjonsgresner.
- En optimalisert metode bør etter hvert også testes på pasientprøver. Først på frisk cerebrospinalvæske for å se om hypokretin-1 lar seg detektere med den utviklede metoden. Deretter pasientprøver for å se om metoden kan bestemme lavere konsentrasjoner av peptidet. Det er dessuten et poeng å sammenligne hypokretin-1 sin stabilitet i spinalvæske med stabiliteten i surrogatmatriks. Det er for eksempel vist at hypokretin-1 forholder seg stabilt i pasientprøver og tines og fryses [3].
- Etter hvert som pasientprøver skal analyseres bør det lages intern standard for å kunne bestemme konsentrasjonen av peptidet.

- Til slutt bør man se på muligheten for flere forsøk med immunoaffinitet som prøveopparbeidelsesmetode dersom metoden med SPE viser seg å ikke fungere godt nok. Teoretisk gir denne metoden god opprenskning og pene kromatogrammer. Det kan vurderes å bruke andre immunoaffinitet til å inkludere magnetiske kuler eller eventuelt brønner for bedre utbytte.

7. Konklusjon

Hovedmålet for oppgaven var å utvikle en LC-MS-metode for hypokretin-1 som identifiserte og kvantifiserte lave konsentrasjoner av analytten i biologiske matrikser med en egnet prøveopparbeidelsesmetode.

Det ble først laget en LC-MS-metode som detekterte hele hypokretin-1-peptidet i vann og mobilfase A. Det ble også utført tryptisk klipp av peptidet som ga brukbare produkter. Likevel gikk man videre med uklippet hypokretin-1 som syntes å gi bedre resultater.

Det ble testet ut flere prøveopparbeidelsesmetoder der hypokretin-1 ble løst i en surrogatmatriks bestående av fortynnet humant serum. Metodene ble vurdert utfra fem kriterier: Utbytte, Relativt standardavvik, kromatogrammer, kvantifiseringsgrense og metodens kompleksitet. Likt for alle metodene var at utbytte var lavt ($\leq 50\%$). Relativt standardavvik av utbyttene var dessuten høye (ca. 20%). Noen metoder var likevel bedre enn andre. SPE var en av metodene som ga lavest LOQ og var dessuten blant metodene med de reneste kromatogrammene. Det er en enkel og lite tidkrevende metode som foreløpig blir sett på som den beste. SPE-metoden ble optimalisert og utbyttet forbedret. Det ble gjort noen få forsøk med immunoaffinitet som prøveopparbeidelsesmetode. Disse forsøkene ga ikke resultater og flere forsøk med immunoaffinitet bør vurderes dersom SPE alene ikke gir godt nok utbytte.

Foreløpig er det ikke lyktes å oppnå kvantifiseringsgrenser ned mot 110 pg/mL . Med høye RSD og høy LOQ er man fortsatt et stykke unna å kunne bruke LC-MS som diagnostisk verktøy for narkolepsi. Prøvene har riktignok blitt analysert på LC-MS singelkvadрупol og metoden bør overføres til instrumenter med høyere sensitivitet i fremtiden for å redusere LOQ ytterligere.

Kildeliste

1. Ohayon, M.M.M.D.D.P., et al., *Prevalence of narcolepsy symptomatology and diagnosis in the European general population*. Neurology, 2002. **58**(12): p. 1826-1833.
2. M S Heier, T.E., S Vilming, M D Gjerstad, H Schrader, K Gautivk, *CSF Hypocretin-1 Levels and Clinical Profiles in Narcolepsy and idiopathic CNS Hypersomnia in Norway*. Sleep, 2007. **30**(8): p. 969-973.
3. Nishino, S., et al., *Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy*. Annals of Neurology, 2001. **50**(3): p. 381-388.
4. Nishino, S., et al., *Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy*. The Lancet, 2000. **355**(9197): p. 39-40.
5. Mignot, E., et al., *The Role of Cerebrospinal Fluid Hypocretin Measurement in the Diagnosis of Narcolepsy and Other Hypersomnias*. Arch Neurol, 2002. **59**: p. 1553-1562.
6. Bassetti, C., et al., *The narcoleptic borderland: a multimodal diagnostic approach including cerebrospinal fluid levels of hypocretin-1 (orexin A)*. Sleep Medicine, 2002. **4**: p. 7-12.
7. *International Classification of Sleep Disorders – Second Edition (ICSD-2)*. 2005, Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine.
8. Lecea, L.D., et al., *The Hypocretins: Hypothalamus-Specific Peptides with Neuroexcitatory Activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(1): p. 322-327.
9. Sakurai, T., *Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior*. Cell, 1998. **92**(4): p. 573-85.
10. Elias, C.F., et al., *Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area*. The Journal of Comparative Neurology, 1998. **402**(4): p. 442-459.
11. Natsuko Tsujino, T.S., *Orexin/Hypocretin: A Neuropeptide at the Interface of Sleep, Energy Homeostasis, and Reward System*. Pharmacological Reviews, 2009. **61**(2): p. 162-176.
12. Marcus, J.N., et al., *Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain*. The Journal of Comparative Neurology, 2001. **435**(1): p. 6-25.
13. Edwards C M B, A.S., Sunter D, Murphy K G, Ghatei M A, Bloom S R, *The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-*

- concentrating hormone and galanin*. Journal of Endocrinology, 1999. **160**(3): p. R7-R12.
14. Haynes, A.C., et al., *Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice*. Regulatory Peptides, 2002. **104**(1-3): p. 153-159.
 15. Haynes, A.C., et al., *A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats*. Regulatory Peptides, 2000. **96**(1-2): p. 45-51.
 16. Chemelli, R.M., et al., *Narcolepsy in orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation*. Cell, 1999. **98**(4): p. 437-451.
 17. Thannickal, T.C., et al., *Reduced Number of Hypocretin Neurons in Human Narcolepsy*. Neuron, 2000. **27**(3): p. 469-474.
 18. Lee, M.G., H.O. K, and B.E. Jones, *Discharge of Identified Orexin/Hypocretin Neurons across the Sleep-Waking Cycle* The journal of neuroscience, 2005. **25**(28): p. 6716-6720.
 19. Artru, A.A., *Spinal Cerebrospinal Fluid Chemistry and Physiology*, in *Spinal Drug Delivery*, T.L. Yaksh, Editor. 1999, Elsevier Science B.V.: Amsterdam.
 20. Saunders, N., M. Habgood, and K. Dziegielewska, *Barrier Mechanisms in the brain, I. Adult Brain*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 1999. **26**(1): p. 11-19.
 21. Thompson, E.J., *Cerebrospinal fluid*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1995. **59**: p. 349-357.
 22. Sickmann, A., et al., *Identification of proteins from human cerebrospinal fluid, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(13): p. 2721-2728.
 23. Yuan, X., et al., *Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome*. Electrophoresis, 2002. **23**(7-8): p. 1185-1196.
 24. Olsen, J.V., S.-E. Ong, and M. Mann, *Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-614.
 25. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics - Tools for the new Biology*. 2002, Totowa NJ: Humana Press Inc.
 26. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, ed. Fagbokforlaget. 2004, Bergen.
 27. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.

28. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 132-142.
29. Balchen, M., L.o. Reubsaet, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of peptides*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(2): p. 143-149.
30. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
31. ProteinProspector. <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>. Oktober 2011.
32. Bodzon-Kulakowska, A., et al., *Methods for samples preparation in proteomic research*. Journal of Chromatography B, 2007. **849**(1-2): p. 1-31.
33. Loftheim, H., et al., *2-D hydrophilic interaction liquid chromatography-RP separation in urinary proteomics – Minimizing variability through improved downstream workflow compatibility*. Journal of Separation Science. **33**(6-7): p. 864-872.